

PATRÍCIA CASTELLEN

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA PROTEÍNA GlnR DE  
*Streptococcus mutans*

Tese apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de Doutora em Ciências-  
Bioquímica, Curso de Pós-Graduação em  
Ciências- Bioquímica, Setor de Ciências  
Biológicas, Universidade Federal do  
Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elaine Machado  
Benelli

CURITIBA, 2011

À minha família

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elaine Machado Benelli, pela orientação, dedicação e amizade que foram muito importantes para minha formação profissional e pessoal.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiane Gomes de Moraes Rego, pela ajuda com os experimentos utilizando material radioativo, pelas sugestões e idéias.

Aos professores Dr. Emanuel Maltempi de Souza e Dr. Luciano Huergo pelas sugestões e discussões que foram muito importantes para aprimorar este trabalho. Obrigada ao Dr. Luciano Huergo pela ajuda nas análises de espectrometria de massa.

Ao Prof. Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa por permitir meu acesso às instalações do Núcleo de Fixação de Nitrogênio sempre que foi necessário.

Ao Prof. Dr. Wanderson da Rocha pela ajuda com o material radioativo.

Ao Prof. Jaime Paba pelas idéias e sugestões de experimentos.

À coordenação do curso de pós-graduação em Ciências – Bioquímica, pelo apoio prestado.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

Às minhas colegas de laboratório: Magda, Charlene e Wanessa pela colaboração nos experimentos.

A todos os integrantes do Núcleo de Fixação de Nitrogênio pela excelente convivência.

A todos os professores do Departamento de Bioquímica por contribuir muito para a minha formação.

Aos meus amigos e família.

A Deus.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	IV
LISTA DE TABELAS.....	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
JUSTIFICATIVA.....	X
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Mecanismos de virulência em <i>S. mutans</i> .....	1
1.1.1 Adesão.....	1
1.1.2 Acidogenicidade.....	2
1.1.3 Tolerância a ácidos.....	2
1.2 Metabolismo de nitrogênio em procariotos.....	3
1.2.1 Sistemas de assimilação de nitrogênio.....	3
1.2.2 Proteínas da família PII.....	6
1.2.3 Assimilação de nitrogênio em gram-positivos.....	9
1.2.3 Assimilação e metabolismo de nitrogênio em <i>S. mutans</i> .....	12
1.3 Organização estrutural das proteínas GlnR .....	14
1.3.1 Família MerR .....	14
1.3.2 Promotores reconhecidos por GlnR .....	15
2. OBJETIVOS .....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1 Análises estruturais dos domínios da proteína GlnR de <i>S. mutans</i> .....	20
3.2 Estirpes e Plasmídeos.....	20
3.3 Meios de Cultura e Condições de Cultivo .....	20
3.4 Manipulação de DNA .....	22
3.5 Determinação da concentração de DNA.....	22
3.6 Transformação gênica .....	23
3.7 Seqüenciamento .....	23
3.7.1 Reação de Seqüenciamento de DNA.....	23

3.7.2 Tratamento da Amostra Após Reação de Sequenciamento .....	23
3.7.3 Edição e Análise das Sequências .....	24
3.8 Clonagem do gene <i>glnR</i> nos vetores de expressão pET28a+ e pET29a+ .....	24
3.9 Otimização das condições de indução e solubilização das proteínas GlnR e GlnR-His. ....	24
3.10 Otimização das condições de purificação da proteína GlnR .....	25
3.11 Purificação da proteína GlnR-His .....	26
3.12 Determinação da Concentração de Proteínas .....	27
3.13 Eletroforese de Proteínas.....	27
3.14 Análise da capacidade de ligação ao DNA da proteína GlnR <i>in vitro</i> .....	27
3.14.1 Amplificação das regiões promotoras dos operons <i>glnRA</i> e <i>amtBglnK</i> .....	27
3.14.2 Marcação radioativa do produto de PCR .....	28
3.14.3 Ensaio de retardamento de migração de banda de DNA em gel.....	28
3.15 Experimento de co-precipitação de GlnR e GlnK-His .....	29
4. RESULTADOS .....	31
4.1 Análise estrutural da proteína GlnR de <i>S. mutans</i> .....	31
4.2 Clonagem do gene <i>glnR</i> nos vetores de expressão pET28a+ e pET29a+ .....	39
4.3 Determinação das condições de indução e solubilidade das proteínas GlnR e GlnR-His .....	43
4.3.1 Determinação do tempo de indução da superexpressão da proteína GlnR.....	43
4.3.2 Solubilidade da proteína GlnR de <i>S. mutans</i> .....	43
4.3.3 Efeito da temperatura de indução na síntese da proteína GlnR .....	46
4.3.4 Efeito da concentração de indutor na eficiência de síntese da proteína GlnR ....	46
4.3.5 Efeito da concentração de indutor na solubilidade da proteína GlnR.....	46
4.4 Purificação da proteína GlnR .....	50
4.5 Purificação da proteína GlnR-His .....	50
4.6 Análise da ligação da proteína GlnR ao DNA à regiões promotoras de genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio.....	53
4.6.1 Estudo dos promotores dos operons <i>amtBglnK</i> e <i>glnRA</i> de <i>S. mutans</i> .....	53
4.6.2 Análise da ligação da proteína GlnR às regiões promotoras dos operons <i>glnRA</i> e <i>amtBglnK</i> de <i>S. mutans</i> .....	56

4.7 Efeito de GlnK na afinidade de ligação de GlnR ao DNA .....	59
4.8 Análise da interação entre as proteínas GlnR e GlnK .....	62
4.9 Efeito de 2-oxoglutarato, ADP e ATP sobre a ligação do complexo GlnR-GlnK ao DNA .....	65
5. DISCUSSÃO .....	71
5.1 Promotores reconhecidos por GlnR.....	71
5.2 Interação GlnR-GlnK.....	72
5.3 Efeito de ADP, ATP e 2-oxoglutarato.....	73
5.4 Efeito de GlnK sobre a ligação GlnR-DNA.....	74
5.5 Efeito de ADP, ATP e 2-oxoglutarato sobre o complexo ternário GlnK-GlnR-DNA.....	74
5.6 Possível efeito de DNA na estabilização do complexo GlnK-GlnR.....	75
5.7 Modelo de regulação da atividade de GlnR.....	78
6. CONCLUSÕES .....	80
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	81

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Assimilação de amônio em <i>E. coli</i> sob baixas concentrações de nitrogênio...	5
Figura 2: Controle do transporte de amônio e do sistema Ntr de <i>E. coli</i> .....	8
Figura 3: Regulação do metabolismo de nitrogênio em <i>B. subtilis</i> .....	11
Figura 4: Estrutura tridimensional do monômero de BmrR .....	16
Figura 5: Seqüência de nucleotídeos de promotores com sítios de ligação para GlnR .....	17
Figura 6: Predição de estrutura secundária da proteína GlnR de <i>S. mutans</i> .....	32
Figura 7: Alinhamento das proteínas GlnR de <i>S. mutans</i> e diversos microrganismos .....	33
Figura 8: Modelo estrutural teórico da proteína GlnR de <i>S. mutans</i> .....	35
Figura 9: Alinhamento estrutural e de seqüências de aminoácidos da proteína GlnR de <i>S. mutans</i> com a proteína MerR de <i>Streptomyces lividans</i> .....	36
Figura 10: Alinhamento das proteínas GlnR de <i>S. mutans</i> e <i>B. subtilis</i> .....	37
Figura 11: Alinhamento das proteínas GlnR de <i>S. mutans</i> e TnrA de <i>B. subtilis</i> .....	38
Figura 12: Comparação de modelos estruturais teóricos das proteínas GlnR de <i>S.</i> <i>mutans</i> e TnrA de <i>B. subtilis</i> .....	39
Figura 13: Árvore filogenética de proteínas GlnR .....	41
Figura 14: Seqüências das regiões promotoras dos operons <i>amtBglnK</i> e <i>glnRA</i> de <i>S.</i> <i>mutans</i> .....	42
Figura 15: Amplificação do gene <i>glnR</i> de <i>S. mutans</i> por PCR .....	44
Figura 16: Efeito do tempo de indução na síntese das proteínas GlnR e GlnR-His na estirpe de <i>E.coli</i> BL21 A1 cultivadas a 37°C .....	45
Figura 17: Solubilidade das proteínas GlnR e GlnR-His sintetizadas nas estirpe BL21A1 a 37°C .....	47
Figura 18: Efeito da temperatura de indução na solubilidade das proteínas GlnR e GlnR-His .....	48
Figura 19: Efeito das estirpes hospedeiras sobre a solubilidade de GlnR e GlnR-His.	49
Figura 20: Efeito das estirpes hospedeiras sobre a solubilidade de GlnR-His .....	51

Figura 21: Efeito da concentração de indutor sobre a solubilidade de GlnR e GlnR-His .....	52
Figura 22: Perfil eletroforético da proteína GlnR purificada .....	54
Figura 23: Proteína GlnR-His purificada por cromatografia de afinidade .....	55
Figura 24: Efeito da concentração de GlnR sobre a ligação ao promotor do operon <i>amtBglnK</i> .....	57
Figura 25: Efeito da concentração de GlnR sobre a ligação ao promotor do operon <i>glnRA</i> .....	58
Figura 26: Efeito da concentração de DNA competidor sobre a ligação de GlnR ao promotor do operon <i>glnRA</i> .....	60
Figura 27: Efeito de GlnK na ligação de GlnR ao promotor do operon <i>glnRA</i> .....	61
Figura 28: Efeito da concentração de GlnK sobre a ligação de GlnR ao promotor do operon <i>glnRA</i> .....	63
Figura 29: Interação de GlnK e GlnR de <i>S. mutans in vitro</i> .....	64
Figura 30: Efeito de 2-oxoglutarato, ADP e ATP sobre a afinidade do complexo GlnR-GlnK ao DNA .....	66
Figura 31: Efeito da concentração de 2-oxoglutarato sobre a ligação do complexo GlnR-GlnK ao DNA .....	67
Figura 32: Efeito da concentração de ADP sobre a ligação do complexo GlnR-GlnK ao DNA .....	68
Figura 33: Efeito da concentração de ATP sobre a ligação do complexo GlnR-GlnK ao DNA .....	69
Figura 34: Efeito de 2-oxoglutarato, ADP e ATP sobre a afinidade do complexo GlnR-GlnK ao DNA .....	70
Figura 35: Alinhamento de sequência das proteínas GlnK de <i>S. elongatus</i> , GlnZ de <i>A. brasilense</i> e GlnK de <i>S. mutans</i> .....	76
Figura 36: Modelo de controle da atividade de GlnR por GlnK em <i>S. mutans</i> .....	79



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estirpes e plasmídeos.....	21
---------------------------------------	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP] = [ $\gamma$ [<sup>32</sup>P] 5' trifosfato de adenosina

ADP= 5'difosfato de adenosina

Ampr= resistência a ampicilina

Arg= arginina

ATase= enzima adenosina transferase

ATP= 5'trifosfato de adenosina

bp= pares de bases

D.O.= densidade óptica

DNA= ácido desoxirribonucleico

EDTA= ácido etilenodiamino-tetra ético

FBI-GS= glutamina sintetase inibida por ligação com glutamina

GDH= glutamato desidrogenase

Gln= glutamina

Gly= glicina

GOGAT= glutamato sintase

GS= glutamina sintetase

His= histidina

Ile= isoleucina

IOD= densidade óptica de imagem

IPTG= isopropil-tio-galactosídeo

kb= quilobase

kDa= quilodaltons

Km= canamina

Leu= leucina

Lys= lisina

PCR= reação em cadeia da polimerase

PMSF= fluoreto de fenilmetilsulfonil

rpm= rotações por minuto

Thr= treonina

Tris= tris(hidroximetil)-aminometano

UMP= uridilil monofosfato

## RESUMO

A regulação a nível transcricional de genes do metabolismo de nitrogênio é bem descrita em um grande número de bactérias, como *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Escherichia coli* e *Streptomyces coelicolor*. Entretanto, até o momento não há informações sobre esta regulação em *Streptococcus mutans*. O presente trabalho tem por objetivo caracterizar a atividade da proteína GlnR, reguladora global da transcrição de genes do metabolismo de nitrogênio em microrganismos Gram-positivos. A atividade de GlnR foi analisada por ensaios de retardamento de banda de DNA em gel. Esta proteína liga-se especificamente às regiões promotoras dos operons *glnRA* e *amtBglnK*. Além disso, experimentos de co-precipitação mostraram que GlnR liga-se *in vitro* a GlnK, uma proteína sinalizadora dos níveis intracelulares de nitrogênio que coordena a regulação do metabolismo de nitrogênio em procariotos. GlnK aumenta a afinidade de GlnR pelo promotor do operon *glnRA*. A formação do complexo GlnK-GlnR é regulada pelos níveis de 2-oxoglutarato e ADP, moléculas moduladoras da atividade de GlnK. Estes resultados sugerem o envolvimento de GlnR na regulação transcricional de genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio em *S. mutans* e que a proteína GlnK é responsável pela transdução de sinal da disponibilidade de nitrogênio para GlnR e possivelmente regula sua atividade.

## ABSTRACT

Transcriptional regulation of nitrogen metabolism genes has been investigated in a variety of bacteria, such as *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Escherichia coli* and *Streptomyces coelicolor*. However, until now there has been no study for *Streptococcus mutans*. In this study, the DNA- binding activity of GlnR was characterized by gel mobility shift assays. This protein specifically binds to the promoter regions of *glnRA* and *amtBglnK* operons. In addition, pull-down assays showed that GlnR interacts with GlnK, a signal transduction protein that coordinates the regulation of nitrogen metabolism in prokaryotes. GlnK enhances the affinity of GlnR for the promoters of *glnRA* operon. The complex formation is modulated by 2-oxoglutarate and ADP, effector molecules of GlnK. These results confirmed the involvement of GlnR in transcriptional regulation of nitrogen metabolism related genes in *S. mutans* and suggest that GlnK relays the information on ammonium availability to GlnR.

## JUSTIFICATIVA

A cárie dental é um processo patológico de etiologia microbiana, que resulta na destruição localizada dos tecidos dentários. É uma das doenças mais comuns de humanos (FEJERSKOV & THYLSTRUP, 2001). *S. mutans* foi isolado de lesões cariosas e, além da cárie, este microrganismo é responsável por algumas inflamações oculares de neonatos e endocardite (CLARKE, 1924, ALALUUSUA et al., 1994, PARKER & BALL, 1976; REEDER et al., 1985).

Os mecanismos de virulência em *S. mutans* incluem adesão e colonização da superfície dos dentes, acidogenicidade e tolerância a ácidos (BANAS, 2004). Um estudo recente caracterizou o envolvimento de GlnR, uma proteína regulatória global do metabolismo de nitrogênio na resposta de tolerância a ácidos em *S. mutans* (CHEN et al., 2010). A influência do metabolismo de nitrogênio sobre a virulência também foi descrito em outras bactérias gram-positivas como *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *Bacillus anthracis* e *Staphylococcus aureus* (GUSTAFSON et al., 1994, TAMURA et al., 2002, VAN SCHAIK et al., 2009, KLOOSTERMAN et al., 2006, SOMERVILLE & PROCTOR, 2009).

Em membros da classe *Bacilli* como *Staphylococcaceae*, *Listeriae* e *Lactobacillales*, a regulação do metabolismo de nitrogênio é dependente de GlnR, proteína responsável pela ativação ou repressão da transcrição de genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio (revisto por AMON et al., 2010). Assim, a caracterização funcional de GlnR de *S. mutans* pode contribuir para o entendimento da regulação da expressão de genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio neste microrganismo. A descrição de possíveis mecanismos de regulação de vias metabólicas pode contribuir para futuros estudos sobre a ligação entre o metabolismo de nitrogênio e mecanismos de virulência neste microrganismo.

## 1. INTRODUÇÃO

A cárie dental é uma doença infecciosa que resulta em dissolução localizada e destruição do tecido calcificado. É uma das doenças mais comuns de humanos. No Brasil, quase 38% das crianças de 18 a 36 meses apresentam pelo menos uma cárie dentária; entre as crianças de cinco anos de idade, o índice chega a 60%. A média de dentes cariados, perdidos ou obturados por indivíduo é de 4,8 nas crianças de até 12 anos, 8,2 nos adolescentes, 24,1 nos adultos e 37,8 nos idosos (BRASIL, 2003).

As principais espécies isoladas de lesões cariosas e que estão envolvidas na iniciação e desenvolvimento das cáries são: *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces viscosus* e *Streptococcus mutans* (EBERSOLE & TAUBMAN, 1994, SOCRANSKY et al., 1998). *S. mutans* foi isolado de lesões cariosas por Clarke em 1924. Esta bactéria é acidogênica, capaz de fermentar glucose, lactose, rafinose e manitol com produção de ácido (CLARKE, 1924). Usualmente coloniza a superfície dental, mas também pode ser encontrado na saliva, na língua e nas membranas mucosas, sendo responsável por algumas inflamações oculares de neonatos e endocardite, além da cárie (ALALUUSUA et al., 1994, PARKER & BALL, 1976; REEDER et al., 1985).

### 1.1 Mecanismos de virulência de *S. mutans*

Através de estudos bioquímicos foram identificadas neste microrganismo três propriedades importantes no processo de formação da cárie: adesão e colonização da superfície dos dentes, acidogenicidade e tolerância a ácidos (BANAS, 2004).

#### 1.1.1 Adesão

*S. mutans* coloniza a superfície dos dentes participando na formação do biofilme dental. Este biofilme, ou placa bacteriana, é um agregado microbiano imerso numa matriz de polissacarídeos extracelulares resultante da aderência, multiplicação e desenvolvimento de microrganismos sobre a superfície dos dentes, em presença de substrato (CVITKOVITCH et al., 2003).

Freqüentemente o biofilme existe em equilíbrio com o hospedeiro, sem provocar danos aos tecidos bucais (MARSH, 1994; BRADSHAW & MARSH, 1998; MARSH, 2003). Entretanto, perturbações nas condições ambientais podem causar mudanças na composição e metabolismo do biofilme. A exposição freqüente dos microrganismos que compõem o biofilme a carboidratos fermentáveis leva à diminuição do pH no biofilme (JENSEN & SCHACHTELE, 1983). Nestas condições, microrganismos resistentes a ácidos

são selecionados e o biofilme cariogênico é formado (VAN HOUTE, 1980). Neste caso, há uma prevalência dos estreptococos do grupo mutans, principalmente *S. mutans* e outros microrganismos acidúricos como os lactobacilos e leveduras.

### 1.1.2. Acidogenicidade

*S. mutans* possui uma via glicolítica completa e os produtos finais do metabolismo de carboidratos neste organismo variam dependendo das condições do meio (HAMADA & SLADE, 1980). Quando o organismo cresce em presença de excesso de glucose, o ácido láctico é o principal produto de fermentação. Em condições limitantes de glucose, além de ácido láctico, são produzidos: formato, acetato e etanol. A velocidade de produção de ácidos por *S. mutans* é maior que a de outros estreptococos, na faixa de pH entre 5-7 (DE SOET et al., 2000). A acidogenicidade deste microrganismo promove mudanças ecológicas na microflora da placa provocando o aumento do número de *S. mutans* e outras espécies acidogênicas e ácido-tolerantes. Quando o hospedeiro ingere carboidratos fermentáveis, os produtos do metabolismo desta microbiota reduzirão o pH da placa. Quando o pH da placa dental é reduzido a níveis inferiores ao pH crítico de 5,5, ocorre a desmineralização dos cristais de hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) do esmalte dentário iniciando a lesão de cárie dental (FEJERSKOV & THYLSTRUP, 2001).

### 1.1.3 Tolerância a ácidos

À medida que o pH do biofilme é reduzido, um sistema de resposta a ácidos é ativado em *S. mutans*. Nesta resposta o sistema  $\text{F}_0\text{F}_1$ -ATPase translocador de prótons ligado a membrana, que é estável em meio ácido, mantém o pH intracelular em 7,5 e protege as enzimas da via glicolítica mantendo o pH compatível com os processos biológicos (QUIVEY et al., 2001; LEMOS et al, 2005).

A diminuição do pH no meio também induz o aumento da síntese das chaperonas GroEL e DnaK, que impedem a agregação e erros no enovelamento das proteínas causados pela acidificação (JAYARAMAN et al., 1997; LEMOS et al., 2001). A proteína ClpA também parece ser importante para adaptação metabólica a ácidos. Estirpes de *S. mutans* que não sintetizam ClpA são incapazes de crescer em baixo pH (LEMOS & BURNE, 2002).

Estudos comparativos do proteoma de *S. mutans* cultivado em pH 5,2 e 7,0 indicaram que trinta proteínas exibem expressão alterada em baixo pH. Dentre estas 18 foram expressas em maior quantidade incluindo: endopeptidases, fosfoglucomutase,

chaperonas, proteínas de divisão celular, enolases, lactato desidrogenase, frutose bifosfato aldolase, acetoina redutase, superóxido dismutase e lactoilglutathione liase (WILKINS et al., 2002).

Um estudo recente descreveu uma conexão entre o metabolismo de nitrogênio e a resposta de tolerância a ácidos em *S. mutans*. Através de análises do padrão de transcrição, este estudo mostrou que genes responsáveis pela assimilação de nitrogênio são reprimidos pela proteína GlnR durante choque ácido e um mutante *glnR*<sup>-</sup> têm viabilidade reduzida em 10 vezes em pH 2,8 (CHEN et al., 2010). Além de *S. mutans*, a influência do metabolismo de nitrogênio sobre a virulência foi descrito em outras bactérias gram-positivas como *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *Bacillus anthracis* e *Staphylococcus aureus* (GUSTAFSON et al., 1994, TAMURA et al., 2002, VAN SCHAIK et al., 2009, KLOOSTERMAN et al., 2006, SOMERVILLE & PROCTOR, 2009).

## 1.2 Metabolismo de nitrogênio em procariotos

### 1.2.1 Sistemas de Assimilação de Nitrogênio

Em condições de excesso de nitrogênio no ambiente, ocorre a difusão de amônio (neste trabalho o termo amônio incluirá as espécies  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NH}_3$ ) através da membrana. Esta forma de captação de amônio ocorre em concentrações extracelulares maiores que 50 $\mu\text{M}$  (JAVELLE et al., 2004). Quando as concentrações de nitrogênio são limitantes, a captação deste nutriente é realizada por proteínas transportadoras de alta afinidade da família Amt (KLEINER, 1985). Em *E. coli*, a presença de AmtB permite o crescimento em concentrações de amônio inferiores a 5 $\mu\text{M}$  (JAVELLE et al., 2007).

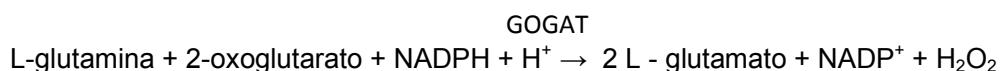
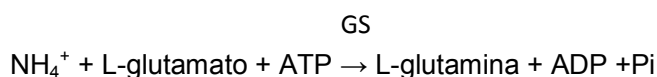
O processo de transporte de amônio mediado por AmtB é regulado em diferentes níveis. Em *E. coli*, o gene *amtB* forma um operon com *glnK*, este operon é regulado transcricionalmente pelo sistema de dois componentes NtrBC. O operon é expresso em baixa disponibilidade de amônio. Quando a concentração de amônio é maior que 50 $\mu\text{M}$ , a difusão livre de amônio através da membrana é suficiente para suprir o nitrogênio necessário para o crescimento celular e AmtB não é necessária (JAVELLE et al., 2004). GlnK é uma proteína regulatória que apresenta alta similaridade de seqüência com uma proteína sinalizadora de nitrogênio GlnB. A função de GlnK é ligar a AmtB para bloquear o transporte de amônio (DURAND & MERRICK, 2006, GRUSWITZ et al., 2007, JAVELLE & MERRICK, 2005). Em baixas concentrações de amônio, GlnK é uridililada por GlnD, a mesma uridilil transferase que uridilila GlnB. GlnK uridililada não é capaz de ligar-se a AmtB. O aumento da concentração de amônio leva à deurililação de GlnK, nesta forma ela



liga-se a AmtB, bloqueando o transporte de amônio. Assim, uma das funções de GlnK é bloquear o transporte de amônio via AmtB quando não é necessário.

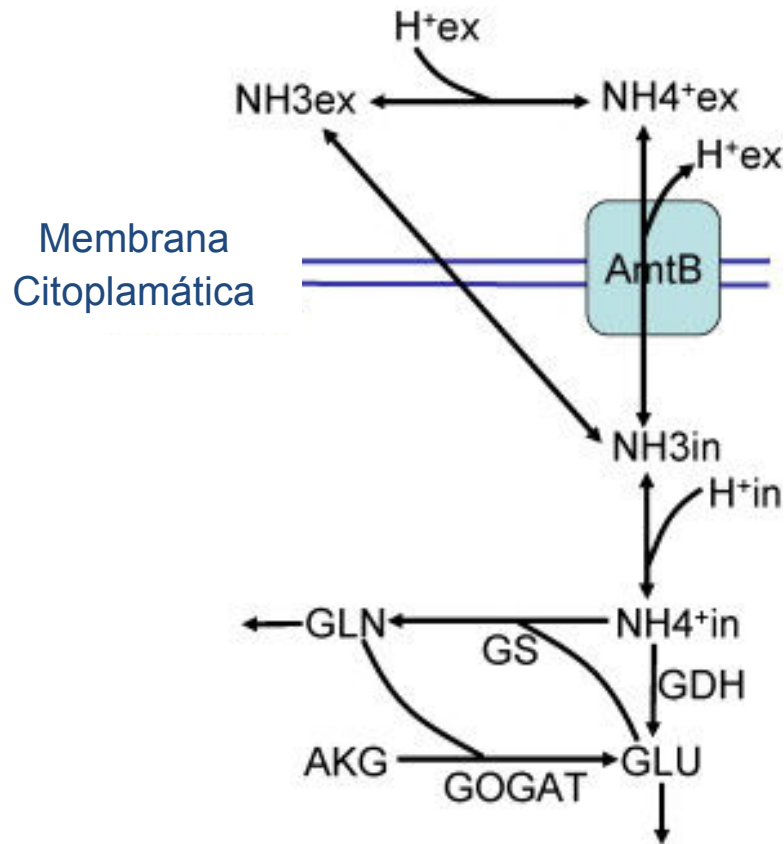
Assim que é captado, o amônio é utilizado na síntese de glutamina e glutamato, que servem como doadores de nitrogênio para as reações biossintéticas (Figura 1). A assimilação do amônio pode ocorrer através de duas vias principais: a glutamina sintetase/glutamato sintase (GS/GOGAT), a qual é importante em baixos níveis de nitrogênio, e a glutamato desidrogenase (GDH), ativa em altos níveis nitrogênio devido a baixa afinidade da enzima para  $\text{NH}_4^+$  (MERRICK e EDWARDS, 1995).

As reações que compõem esta via são as seguintes:



A glutamato sintase catalisa a aminação redutiva do 2-oxoglutarato, produzindo glutamato, empregando glutamina como doadora de nitrogênio. A glutamina sintetase catalisa a reação de formação da glutamina a partir de glutamato e  $\text{NH}_4^+$ . Em bactérias entéricas, a GS é uma enzima regulada, tanto a nível transcricional como pós-traducional. Produtos finais do metabolismo da glutamina, como a alanina e a glicina, são inibidores alostéricos de GS. Além da regulação alostérica há a inibição por adenililação, que aumenta ainda mais a sensibilidade da enzima aos inibidores alostéricos (MAGASANIK, 1993). Em bactérias entéricas, a adenililação e desadenililação da GS são promovidas pela adenilil transferase GlnE (SHAPIRO & STADTMAN, 1968). Esta modulação permite um decréscimo da atividade da glutamina sintetase quando os níveis de glutamina são altos, e um aumento de sua atividade quando os níveis de glutamina são baixos e 2-oxoglutarato e ATP estão disponíveis (MERRICK e EDWARDS, 1995). Em *S. mutans*, o gene *glnA*, que codifica para a glutamina sintetase, faz parte do operon *glnRA* e os genes *gltA* e *gltB*, que codificam para a glutamato sintase, foram identificados imediatamente a jusante do operon *glnRA* (AJDIC, et al, 2002). Diferentemente do que ocorre em bactérias

Figura 1: Assimilação de amônio em *E. coli* sob baixas concentrações de nitrogênio



Modelo esquemático da assimilação de amônio pelo sistema AmtB em baixos níveis de nitrogênio no ambiente. O processo de assimilação de amônio segue os seguintes passos inicia-se com o transporte de amônio por difusão e via AmtB. Em seguida a utilização de amônio intracelular ocorre via glutamina sintetase (GS), glutamato sintase (GOGAT) e glutamato desidrogenase (GDH) com a síntese de glutamato (GLU) e glutamina (GLN). Estes aminoácidos são utilizados para síntese de proteínas e transferência de grupo amino. AKG: 2-oxoglutarato (Esquema adaptado de Ma et al., 2009).

entéricas, o gene *glnE* não foi identificado no genoma de *S. mutans*, sugerindo que GS não sofre modificação pós-traducional por adenilação/desadenilação neste organismo (AJDIC et al, 2002).

A segunda via de assimilação de amônio envolve a enzima glutamato desidrogenase (GDH):



A glutamato desidrogenase catalisa a reação reversível da aminação do 2-oxoglutarato por amônio formando glutamato, e utilizando as coenzimas NADH ou NADPH. Em microrganismos, a GDH NADH-dependente parece estar envolvida em funções catabólicas enquanto a NADPH-dependente em funções anabólicas (BENDER et al., 1976).

Como as vias de assimilação de amônio envolvem a utilização de 2-oxoglutarato como substrato para a síntese de aminoácidos, a disponibilidade intracelular de nitrogênio é representada pela razão glutamina/ 2-oxoglutarato. Em condições de privação de nitrogênio há um acúmulo intracelular de 2-OG. Quando há disponibilidade de amônio, o 2-oxoglutarato intracelular é convertido a glutamina, esta age como fonte de nitrogênio intracelular para reações biossintéticas.

Em bactérias entéricas, o sistema global de regulação de nitrogênio (Ntr), modula a síntese e, em alguns casos, a atividade de proteínas responsáveis pela assimilação de amônio. O sistema *ntr* é composto por: GlnD, uma uridililtransferase/uridililase (UTase/UR), um sistema de dois componentes composto pela proteína quinase NtrB e a ativadora de transcrição NtrC, as proteínas de transdução de sinal da família PII GlnB e GlnK e a transportadora de amônio AmtB (BROWN et al., 1971, KAMBEROV et al., 1994, revisto em MERRICK & EDWARDS, 1995, JAVELLE et al., 2004, JAVELLE & MERRICK, 2005).

### 1.2.2 Proteínas da família PII

As proteínas do tipo PII são transdutoras de sinais de nitrogênio, carbono e energia. Coordenam a regulação do metabolismo de nitrogênio modulando a atividade de enzimas, sistemas de transporte de membrana e fatores de transcrição (ARCONDÉGUY et al., 2001, JIANG & NINFA, 2007).

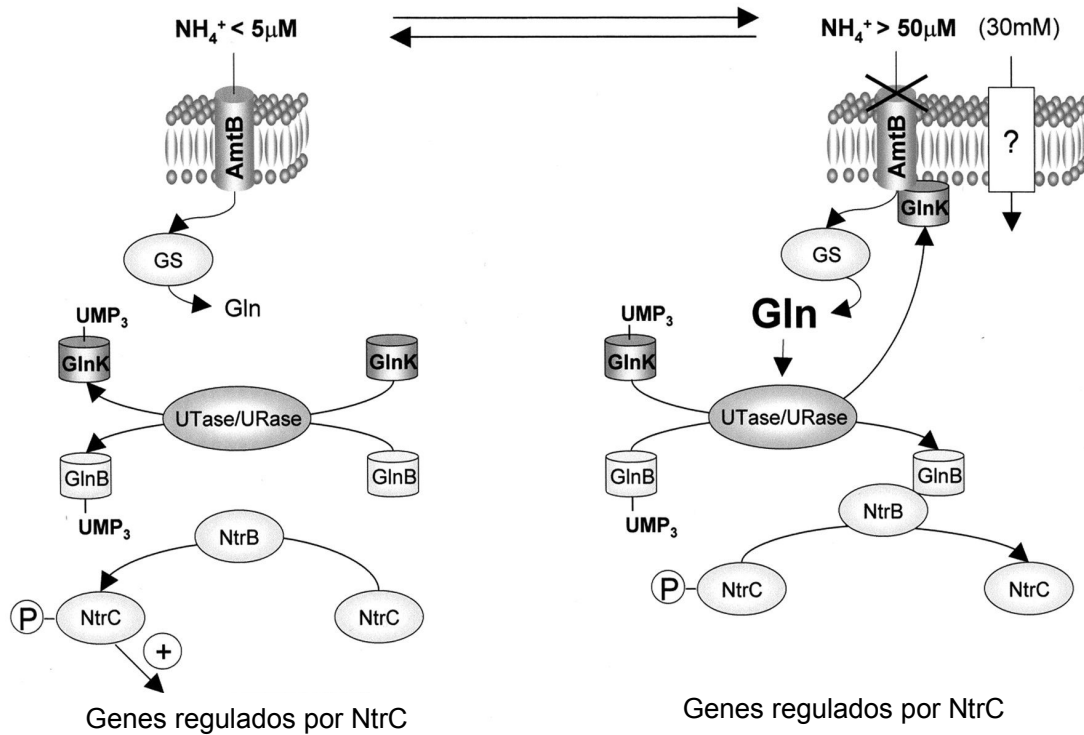
*E. coli* tem dois homólogos de proteínas PII, GlnB e GlnK, codificadas respectivamente pelos genes *glnB* e *glnK*. Sob condições limitantes de nitrogênio, GlnB é uridililada por GlnD e interage com a adenilil transferase (GlnE) para ativar GS através de

desadenililação. Em condições de excesso de nitrogênio GlnB é desuridilada e interage com GlnE que por sua vez adenilila GS, desativando-a. GlnB também regula a transcrição da GS a partir do gene *glnA* interagindo com a quinase/fosfatase NtrB que fosforila NtrC. NtrC fosforilada ativa a transcrição de genes envolvidos na assimilação de fontes alternativas de nitrogênio (Figura 2) (MERRICK & EDWARDS, 1995, JIANG et al., 1998, WEISS et al., 2002).

GlnK, paróloga de GlnB, é co-transcrita o gene *amtB* que codifica para a proteína de membrana AmtB (THOMAS et al., 2000). Sob condições de excesso de nitrogênio GlnK interage com AmtB bloqueando a captação de amônio (JAVELLE & MERRICK, 2005). GlnK tem dois modos de percepção dos níveis de nitrogênio intracelular (NINFA & ATKINSON, 2000). Um modo é através de modificação pós-traducional em resposta a concentração celular de glutamina. Em bactérias entéricas a atividade de GlnK é regulada por uridililação, em actinobactérias GlnK é controlada por adenililação e em cianobactérias por fosforilação (NINFA & JIANG, 2005, HESKETH et al., 2002, FORCHAMMER & TANDEAU DE MARSAC, 1995). Outro modo, conservado em quase todas as proteínas do tipo PII, consiste na ligação das moléculas efetoras ATP, ADP e 2-oxoglutarato (FORCHHAMMER, 2008, JIANG & NINFA, 2007, NINFA & JIANG, 2005).

Em diferentes organismos, a interação de proteínas da família PII com seus alvos é inibida por 2-OG. A formação do complexo GlnK-AmtB ocorre somente em baixos níveis de 2-OG em *E. coli*, *Rhodospirillum rubrum*, *Methanococcus jannaschii* e *B. subtilis* (NINFA & JIANG, 2005, TEIXEIRA et al., 2008, WOLFE et al., 2007, YILDIZ et al., 2007, HEINRICH et al., 2006). Outras proteínas que ligam a PII foram identificadas. Em cianobactérias e plantas, proteínas PII interagem com a enzima N-acetil-Lglutamato quinase (NAGK), responsável pelo controle da biossíntese de arginina (HEINRICH et al., 2004, MAHESWARAN et al., 2004, BURILLO et al., 2004). Além disso, em cianobactérias, PII afeta a expressão gênica através de ligação ao co-ativador transcricional de NtcA (reguladora global do metabolismo de nitrogênio), PipX (ESPINOSA et al., 2006). Em plantas, a acetil-CoA carboxilase é regulada por proteínas da família PII (FERIA-BOURRELLIER et al., 2010). Em *B. subtilis*, a ligação de GlnK a AmtB e TnrA foi descrita (HEINRICH et al., 2006).

Figura 2: Controle do transporte de amônio e do sistema Ntr de *E. coli*.



Quando a concentração extracelular de amônio está em cerca de  $5\mu\text{M}$  ou menos, amônio entra na célula via AmtB e é convertido a glutamina por GS. A concentração de glutamina intracelular é baixa, e a uridilil transferase GlnD (UTase) uridilila GlnK e GlnB. NtrB fosforila NtrC, ativando a expressão dos genes regulados por NtrC. Quando a concentração extracelular de amônio aumenta acima de  $50\mu\text{M}$ , a concentração intracelular de glutamina aumenta, o que favorece a deuridililação de GlnK e GlnB. GlnK liga-se a AmtB inibindo o transporte de amônio. GlnB interage com NtrB e esta defosforila NtrC, impedindo a expressão de genes dependentes de NtrC. Em altas concentrações extracelulares de amônio (30mM por exemplo), este é capaz de atravessar livremente a membrana. (Esquema adaptado de JAVELLE et al., 2004).

Apesar de estes alvos não apresentarem elementos estruturais comuns, em todos os casos a interação com PII é inibida por 2-OG. Em *Azospirillum brasilense*, GlnZ, homólogo de GlnK, liga-se a AmtB e DraG, enzima que modula a atividade da nitrogenase redutase por modificação covalente, de forma dependente da disponibilidade de amônio (HUERGO et al., 2007).

A determinação de estruturas de proteínas PII co-cristalizadas com moléculas efetoras permitiu a localização dos sítios de ligação com ADP, ATP e 2-OG (FOKINA et al., 2010, TRUAN et al., 2010). Moléculas de ADP e ATP competem pelo mesmo sítio. Na presença de Mg-ATP, três moléculas de 2-OG podem ligar-se ao trímero, já quando o ADP está ligado a afinidade por 2-OG diminui (NINFA & JIANG, 2005, JIANG & NINFA, 2009). Por outro lado, a proteína PII de *Arabidopsis thaliana* é capaz de ligar-se a 2-OG na presença de ADP (SMITH et al., 2003).

Uma queda rápida nos níveis celulares de 2-OG foi descrita no primeiro minuto após um choque de amônio em *E. coli* (YUAN et al., 2009). Aparentemente, esta queda é um dos fatores necessários para o seqüestro de GlnK por AmtB em *E. coli*. Além desta variação na concentração de 2-OG uma modificação na razão ATP/ADP é importante para a modulação da ligação AmtB-GlnK (RADCHENKO et al., 2010).

### 1.2.3 Assimilação de Nitrogênio em Gram Positivos

Em bactérias gram-positivas a regulação do metabolismo de nitrogênio a nível transcricional varia entre os diferentes filos e mesmo entre famílias, enquanto enzimas assimilatórias (glutamina sintetase e glutamato sintase) e proteínas de transdução de sinal (adenililtransferase, uridililtransferase e proteínas do tipo PII) são amplamente conservadas (AMON et al., 2010).

Neste grupo, o metabolismo de nitrogênio foi melhor estudado em *Bacillus subtilis*, sendo considerado modelo para estudo em bactérias gram-positivas com baixo teor de G+C. Neste organismo, a atividade da GS não é controlada por modificação pós-traducional e não há evidências da existência de um sistema global para a regulação do nitrogênio, análogo ao sistema Ntr das enterobactérias (FISHER & SONENSHEIN, 1984; FISHER & SONENSHEIN, 1991; WRAY et al., 1994, WRAY & FISHER, 2005).

A regulação a nível transcricional dos genes do metabolismo de nitrogênio depende da cooperação entre duas proteínas, GlnR e TnrA, pertencentes à família MerR de reguladores de transcrição (Figura 3) (SCHREIER et al., 1989, WRAY et al., 1996). Os domínios N-terminais de GlnR e TnrA são muito similares e ambas as proteínas ligam-se a

seqüências de DNA similares (TGTNAN<sub>7</sub>TNACA) (GUTOWSKI & SCHREIER, 1992; NAKANO et al., 1995; BROWN & SONENSHEIN, 1996; WRAY et al., 1996; 1998). O domínio C-terminal que é transdutor de sinal de nitrogênio é variável.

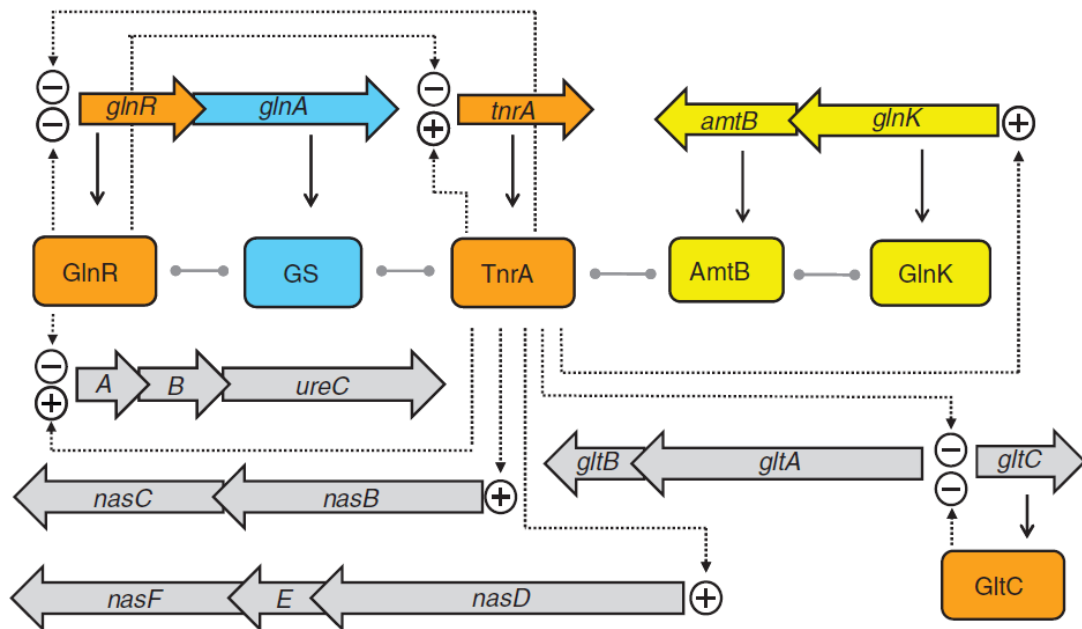
De acordo com os dados de seqüenciamento genômico, ortólogos de TnrA estão presentes em todos os membros da família *Bacillaceae*, com exceção de *B. cereus*, *B. anthracis* e *B. thuringiensis*. Por outro lado, a regulação do metabolismo de nitrogênio em outros membros da classe *Bacilli* como *Staphylococcaceae*, *Listeriae* e *Lactobacillales* é exclusivamente dependente de homólogos de GlnR (DOROSHCHUK et al., 2006, SCHREIER et al., 2000, VARMANEN et al., 2000, KLOOSTERMAN et al., 2006, LARSEN et al., 2006, HENDRIKSEN et al., 2008)

TnrA é uma proteína reguladora global do metabolismo de nitrogênio em *B. subtilis*, ativando a transcrição dos genes *amtB* (inicialmente denominado *nrgA*), *glnK* (inicialmente denominado *nrgB*), *ureABC* (urease) e dos operons *nasBC* e *nasDEF* (nitrato e nitrito redutase), em resposta a limitação de nitrogênio. TnrA também regula positivamente sua própria síntese. Além disso, TnrA regula negativamente a expressão de genes que codificam para enzimas envolvidas na assimilação de amônio, glutamina sintetase (operon *glnRA*) e glutamato sintase (*gltAB*) em limitação de nitrogênio (WRAY et al., 1996, 1998, BRANDENBURG et al., 2002, NAKANO et al., 1998, BELITSKY et al., 2000).

GlnR é repressora de transcrição e está ativa durante crescimento em excesso de nitrogênio. Nestas condições inibe a transcrição dos operons *glnRA*, *tnrA* e *ureABC* (WRAY et al., 1997). Assim, GlnR e TnrA além de regularem sua própria síntese, fazem regulação cruzada entre si.

Em *B. subtilis* *glnA* é co-transcrito com *glnR* a partir do promotor do operon *glnRA*. Este operon é transcrito a partir de um promotor vegetativo dependente de  $\sigma^A$  (SCHREIER et al., 1989). A atividade de GS é inibida por glutamina que se liga à ela em altas concentrações de amônio (SCHREIER et al., 1989, WRAY et al., 1994, WRAY & FISHER, 2005). A glutamina sintetase inibida por “*feed back*” (FBI-GS) regula a atividade das reguladoras transcricionais, estabilizando o complexo GlnR-DNA e bloqueando a ligação de TnrA ao DNA (FISHER & WRAY, 2009, WRAY & FISHER, 2008). A regulação por FBI-GS leva a um aumento na atividade de GlnR sob altos níveis de nitrogênio e a uma atividade máxima de TnrA em baixos níveis de nitrogênio (ATKINSON & FISHER, 1991, WRAY, et al., 1996; FISHER & DÉBARBOUILLÉ, 2002).

Figura 3: Regulação do metabolismo de nitrogênio em *B. subtilis*



Modelo de regulação do metabolismo de nitrogênio em *B. subtilis*. As setas coloridas indicam o tamanho relativo e a organização dos genes no cromossomo. Setas pontilhadas ilustram as interações regulatórias dos respectivos reguladores do metabolismo de nitrogênio (laranja) inclusive sua função na ativação (+) ou repressão (-) dos genes-alvo. Linhas em cinza com círculos indicam interações pós-traducionais (Esquema adaptado de AMON et al., 2010).



A enzima GOGAT de *B. subtilis* é codificada pelo operon *gltAB* que tem sua expressão regulada pelos níveis celulares de nitrogênio e carbono (FISHER & DÉBARBOUILLÉ, 2002). Na ausência de amônio, a expressão do operon *gltAB* é reprimida por TnrA. Quando os níveis de nitrogênio são favoráveis ao crescimento, TnrA é inativada por FBI-GS, o que permite a transcrição a partir do promotor do operon *gltAB* (FISHER & WRAY, 2009). A transcrição de *gltAB* é estimulada por glucose e requer CcpA, um membro da família LacI e um regulador global do metabolismo de carbono em muitas bactérias gram-positivas (FAIRES et al., 1999, BELITSKY et al., 2004). Além disso, a proteína GltC também regula a transcrição de *gltAB*. GltC têm sua atividade determinada pela interação a dois ligantes. Ligada a 2-oxoglutarato GltC ativa a transcrição do operon *gltAB* e após a interação com glutamato, GltC reprime a transcrição a partir do promotor deste operon (BOHANNON & SONENSHEIN, 1989, PICOSSI et al., 2007).

A interação entre GlnK e fatores de transcrição foi descrita em microrganismos gram-positivos. Em *B. subtilis*, TnrA interage com GlnK somente em sua forma ligada a AmtB. GlnK não é modificada covalentemente e a ligação de 2-oxoglutarato e ATP solubiliza o complexo. Entretanto o significado fisiológico desta interação permanece desconhecido (HEINRICH et al., 2006). No microrganismo *Corynebacterium glutamicum* GlnK adenilada interagem com AmtR, um repressor de transcrição, levando à desrepressão de genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio (BECKERS et al., 2005).

Em cianobactérias, GlnK afeta a expressão de genes de acordo com os níveis de 2-oxoglutarato, através da ligação de NtcA e PipX. NtcA é um ativador global de transcrição e PipX liga-se a NtcA na presença de 2-oxoglutarato (limitação de nitrogênio) aumentando sua atividade. Em baixos níveis de 2-oxoglutarato (excesso de nitrogênio) GlnK interage com PipX impedindo a ativação de NtcA (ESPINOSA et al., 2006, 2007).

### 1.2.3 Assimilação e Metabolismo de Nitrogênio em *S. mutans*

*S. mutans* é capaz de crescer anaerobicamente em ausência de aminoácidos, usando amônio como única fonte de nitrogênio (MARTIN & WITTENBERGER, 1980). Neste organismo, a assimilação da amônio também ocorre via glutamato desidrogenase (GDH) ou via GS/glutamato sintase (GS/GOGAT) (GRIFFITH & CARLSSON, 1974, MARTIN & WITTENBERGER, 1980). O sistema Ntr não foi identificado neste microrganismo como acontece em gram-negativos.

Um sistema de transporte de glutamina, específico e ATP-dependente, foi caracterizado em *S. mutans* (DASHPER et al., 1993). E a partir da análise de dados de seqüenciamento do genoma de *S. mutans*, foram identificados cinco prováveis

transportadores do tipo ABC para glutamina, enfatizando a sua importância como principal fonte de nitrogênio e substrato para a biossíntese de outros aminoácidos neste microrganismo (AJDÍC et al., 2002).

O glutamato e o aspartato são assimilados através de um sistema de transporte primário dependente de ATP em pH de 5,5 a 8,0. A presença de potássio é indispensável para o transporte de glutamato em *S. mutans* (NOJI et al., 1988).

A biossíntese do glutamato em *S. mutans* pode ser essencial para sua sobrevivência nas condições existentes na placa dental (CVITKOVITCH et al, 1997). Nas camadas mais profundas da placa dental, onde os aminoácidos livres são limitantes, a biossíntese do glutamato ocorre em condições anaeróbicas. Nestas camadas, compostos nitrogenados simples como amônia, produzida pela hidrólise da uréia salivar por outros microrganismos, são, possivelmente, a única fonte de nitrogênio disponível para *S. mutans* (CVITKOVITCH et al, 1997).

Em *S. mutans*, a função de GlnR foi estudada na resposta de tolerância a ácidos. A provável sequência consenso reconhecida por GlnR foi identificada como ATGTNAN<sub>7</sub>TNACAT, quase a mesma sequência encontrada em *B. subtilis* (BRANDENBURG et al., 2002). Análises de microarranjo de RNA permitiram a identificação de genes reprimidos após choque ácido. Entre estes genes, quatro operons possuíam consenso para GlnR na região promotora: *glnRA* que codifica para GlnR e glutamina sintetase, *nrgAB* que codifica para AmtB e GlnK, *glnQHMP* que codifica para um provável transportador de aminoácidos, *citBZC* que codifica para a aconitase A, citrato sintase e isocitrato desidrogenase respectivamente. Através de experimentos de RT-PCR utilizando RNA purificado de uma estirpe mutante *glnR*<sup>-</sup>, foi confirmado o papel de GlnR na repressão da transcrição destes operons. Além disso, a expressão de *glnA* e outros genes foi significativamente aumentada no mutante *glnR*<sup>-</sup> em pH neutro, sugerindo que a atividade de GlnR é modulada pela disponibilidade de nutrientes nestas condições (CHEN et al., 2010).

A regulação do metabolismo de nitrogênio em resposta à disponibilidade deste nutriente em *S. mutans* permanece desconhecida. A análise dos dados de seqüenciamento de *S. mutans* permitiram a identificação dos genes *glnR*, *nrgBA* e *tnrA* que codificam para as proteínas regulatórias GlnR, GlnK, AmtB e TnrA respectivamente. Notavelmente, o metabolismo de nitrogênio está envolvido nos mecanismos de virulência em diversos microrganismos incluindo *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Lactococcus lactis*, *Pseudomonas aeruginosa* (KLOOSTERMAN et al., 2006, POLISSI et al., 1998, POHL et al., 2009, LIAO et al., 2008, SANDERS et al., 1998,

VAN ALST et al., 2007). Assim, o estudo das proteínas identificadas poderá contribuir para o entendimento da patogenidade deste organismo.

### 1.3 Organização estrutural das proteínas GlnR

As proteínas GlnR podem pertencer à diferentes famílias fatores de transcrição. Em *Streptomyces coelicolor* esta proteína pertence à família OmpR que apresenta o domínio de ligação ao DNA hélice-volta-hélice na porção C-terminal (KENNEY, 2002). As proteínas GlnR de *S. mutans* e *B. subtilis* pertencem a família MerR, um grupo de reguladores transcricionais com motivo hélice-volta-hélice de ligação ao DNA na porção N-terminal.

#### 1.3.1 Família MerR

A família MerR de reguladores transcricionais é composta por proteínas diméricas com um domínio N-terminal que possui um motivo hélice-volta-hélice, seguido por uma região de ligação formada por hélices anti-paralelas e um domínio C-terminal responsável pela ligação a efetores. As proteínas da família MerR apresentam divisão muito clara entre a região N-terminal de ligação ao DNA e a região C-terminal responsável pela ligação de um indutor (Figura 4). Os membros apresentam alta similaridade de sequência entre os primeiros 100 aminoácidos, inclusive o motivo hélice-volta-hélice. A sequência da região C-terminal varia de acordo com seus ligantes específicos (revisto por BROWN et al., 2003).

A maioria dos membros é de ativadores de transcrição agindo sobre promotores dependentes de  $\sigma^{70}$  com atividade sub-ótima, nos quais a região espaçadora entre os elementos -10 e -35 reconhecidos pelo fator  $\sigma$  é maior do que  $17 \pm 1$ pb. Estas proteínas respondem à ligação de indutores distorcendo a fita de DNA para permitir a formação do complexo aberto da RNA polimerase e a ativação transcricional. Estes reguladores, em geral, respondem a estímulos ambientais, como estresse oxidativo, metais pesados ou antibióticos (O'HALLORAN & WALSH, 1986, ZENG et al., 1998, revisto por BROWN et al., 2003).

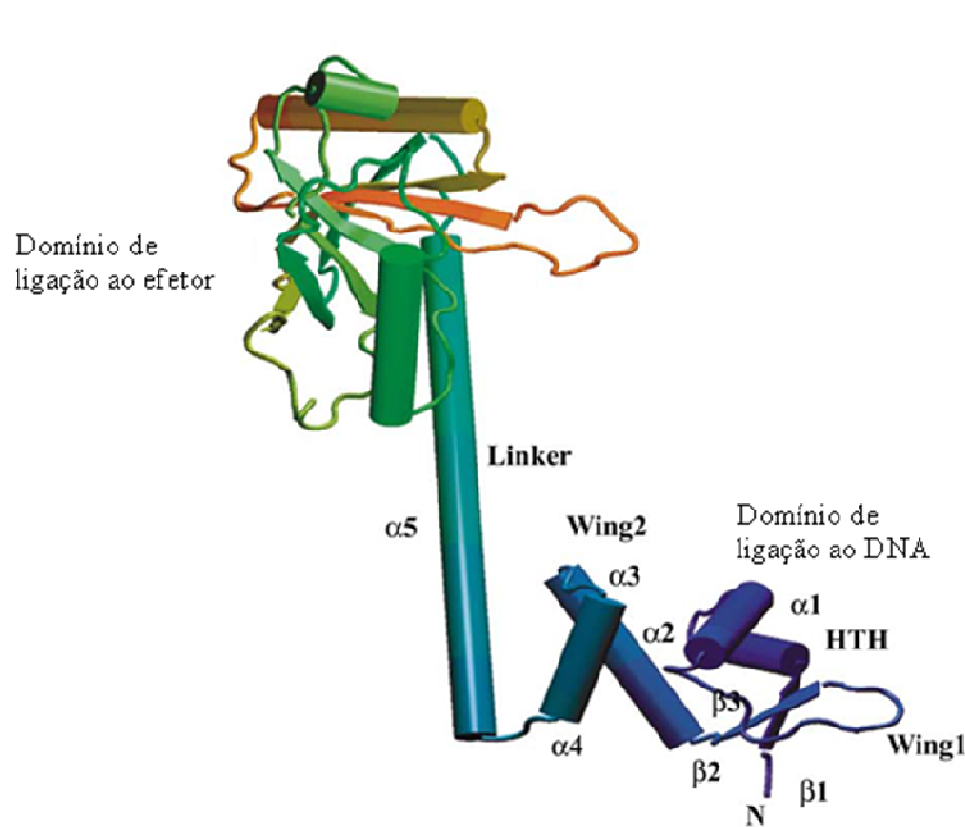
A primeira estrutura publicada de uma proteína da família MerR foi a da proteína BmrR de *B. subtilis* ligada a um fragmento de DNA dupla fita de 22 bp, resolvida com 3 Å de resolução (Figura 4) (HELDWEIN & BRENAN, 2001). BmrR é uma ativadora de transcrição que promove a expressão do gene *bmr*, que codifica para um transportador de membrana, em resposta à entrada de compostos catiônicos lipofílicos (drogas) na célula. Assim, BmrR ativa a resposta celular à exposição a estes compostos tóxicos (AHMED et al., 1994, VAZQUEZ-LASLOP et al., 1999). O monômero de BmrR apresenta três regiões: (1) o domínio N-terminal de ligação ao DNA (resíduos de 1 a 75); (2) uma sequência de ligação (linker) conectando os domínios N- e C-terminal (resíduos 76 a 119) e (3) o

domínio C-terminal responsável pela ligação à drogas (resíduos 120 a 278). O domínio de ligação ao DNA contém quatro  $\alpha$ -hélices e três folhas  $\beta$  anti-paralelas ( $\beta 1$ ,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\alpha 3$  e  $\alpha 4$ ). As hélices de reconhecimento (resíduos 19-28) contatam dois sulcos principais consecutivos e o eixo da hélice é quase perpendicular ao eixo da hélice de DNA. Resíduos presentes na hélice  $\alpha 2$  são responsáveis pela maior parte do contato com DNA (HELDWEIN & BRENNAN, 2001).

### 1.3.2 Promotores reconhecidos por GlnR

Promotores reconhecidos pela proteína GlnR foram caracterizados em outros microrganismos gram-positivos. Em *B. subtilis*, região promotora do operon *glnRA* apresenta duas seqüências reconhecidas por GlnR e a região promotora do operon *amtBglNk* apresenta apenas uma seqüência reconhecida por GlnR (WRAY et al., 1998, 1994) (Figura 5). Nestes promotores, a seqüência reconhecida pela RNA polimerase é similar à da maioria dos promotores de genes expressos durante crescimento vegetativo em *E. coli*, -10 (TATAAT) -35 (TTGACA). A subunidade  $\sigma^A$  da RNA polimerase de *B. subtilis* reconhece fracamente essas seqüências mesmo que tenham alta identidade às seqüências canônicas de *E. coli* (YAMADA et al., 1991). Em microrganismos gram-positivos, é provável que a transcrição a partir desses promotores ocorra com a ajuda de proteínas ativadoras. Em *B. subtilis* a transcrição a partir do promotor do operon *glnRA* é ativada pela proteína TnrA.

Figura 4: Estrutura tridimensional do monômero de BmrR de *B. subtilis*



Região N-terminal do monômero de BmrR mostrando o motivo hélice-volta-hélice e a hélice  $\alpha 5$  na forma ativa (Figura retirada de HELDWEIN & BRENNAN, 2001).

Figura 5: Sequência de nucleotídeos de promotores com sítios de ligação para GlnR

*Bacillus subtilis*

*amtB**glnK* -100 **TGTCAGGAAA** **TCTTACAT**GA AAAT**GGTTTT** TCATTCTTTT TTC**TATAAT** GAAGAAATAT AATAAATTGC

*glnRA* -82 **TGTTAAGAAT** **CCTTACAT**CG TAT**TGACACA** TAATATA**ACA** TCACCTATAA TGAAACTAAG TTAAGAAAAG

*Streptococcus pneumoniae*

*glnRA* -76 **TGTTACATTT** **TATAACAT**TTA TCAAT**TGACG** TTTGTCTTTT TTTAGACTAT AATAGACAGA AAGAAGGAAA

*glnPQ* -91 **TGTTATATTT** **TCTGACA**CGA AAAATATAAC AATTTGCCTT TTTTACTTTT **TTCTGATATA** ATGAGAGAAT

*Lactococcus lactis*

*amtB**glnK* -139 **TGTTATGTTA** **TATAACAT**TGG AATGAGTAAA TGA**TTGACTT** TAACAAAAA CTG**TGTTATA** TTTTAT**TGACA**

*glnRA* - 73 **TGTGACAAAA** **TCTCACAT**TG AAGCT**TGACT** TTGCGAAAGA CAAGGTCTAT AATGATACGT ATGGAGGCGA

As prováveis regiões reconhecidas por  $\sigma^A$  -35 e (“*extended*”) -10 estão destacadas em amarelo. Os sítios de ligação para GlnR estão representados em retângulos. Os números indicam a posição em relação ao códon de início de tradução (LARSEN et al., 2006, KLOOSTERMAN et al., 2006, WRAY et al., 1994, ZALIECKAS et al., 2006).

Em *S. pneumoniae*, o promotor de *glnPQ* apresenta uma sequência reconhecida por GlnR (KLOOSTERMAN et al., 2006). A sequência reconhecida por  $\sigma^A$  é do tipo “*extended -10*”. Nos promotores de genes que apresentam esta sequência a região -10 é o sinal suficiente para o início de transcrição não havendo necessidade da região -35 (PONNAMBALAM et al., 1986, KEILTY & ROSENBERG, 1987, KUMAR et al., 1993). A transcrição a partir desses promotores depende de duas sequências, a região -10 (TATAAT) e da sequência de nucleotídeos 5'-TRTG-3' localizada na posição -12/-15, chamadas em conjunto de motivo “*extended -10*”. Este motivo é freqüentemente encontrado em promotores de *B. subtilis* reconhecidos por  $\sigma^A$  (VOSKUIL & CHAMBLISS, 2002, HELMANN, 1995, CAMACHO & SALAS, 1999). O promotor de *glnRA* apresenta apenas um sítio reconhecido por GlnR e sequências canônicas reconhecidas por  $\sigma^A$  (KLOOSTERMAN et al., 2006).

Em *Lactococcus lactis*, o promotor do operon *amtBglnK* apresenta dois sítios de ligação para GlnR e sítios do tipo “*extended -10*” e -35 para RNA polimerase. E o promotor do operon *glnRA* apresenta apenas um sítio de ligação para GlnR e sequências canônicas -10 -35 para RNA polimerase (LARSEN et al., 2006).

A interação da proteína GlnR de *S. mutans* com outras proteínas ou com promotores de genes envolvidos na regulação do metabolismo de nitrogênio ainda não foi caracterizada. Estes estudos podem contribuir para o entendimento das vias regulatórias do metabolismo de nitrogênio neste microrganismo.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é o de estudar o papel das proteínas GlnR e GlnK na regulação transcricional dos operons *glnRA* e *amtBglnK* de *S. mutans*. Para isso os objetivos específicos são:

1. Clonar do gene *glnR* nos vetores de expressão pET28a+ e pET29a+;
2. Determinar as condições de indução e solubilidade das proteínas GlnR e GlnR-His;
3. Purificar as proteínas GlnR e GlnR-His;
4. Analisar a ligação de GlnR ao DNA;
5. Analisar a interação entre as proteínas GlnR e GlnK;
6. Avaliar a atividade de GlnR ligada a GlnK;
7. Avaliar o efeito de 2-oxoglutarato, ADP e ATP sobre a ligação do complexo GlnR-GlnK ao DNA.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Análises estruturais dos domínios da proteína GlnR de *S. mutans*

Os cálculos de massa molecular e *pI* teórico da proteína GlnR de *S. mutans* foram feitos utilizando o programa ProtParam (GASTEIGER et al., 2005). A análise de estrutura secundária foi realizada através do programa PSIPRED (BRYSON et al., 2005). A busca de domínios funcionais da proteína GlnR foi feita utilizando o programa SMART (SCHULTZ et al., 1998). O programa 3DJigsaw foi utilizado para obtenção de modelos estruturais para os domínios da proteína GlnR de *S. mutans* (BATES et al., 2001). O alinhamento estrutural do modelo de GlnR com outras proteínas estruturalmente semelhantes foi realizado utilizando o programa VAST (GIBRAT et al., 1996). As figuras do modelo estrutural de GlnR de *S. mutans* foram realizadas pelo programa Rasmol (SAYLE & MILNER-WHITE, 1995). O programa CLUSTAL W foi utilizado para alinhar seqüências de aminoácidos (THOMPSON et al, 1994).

#### 3.2 Estirpes e Plasmídeos

As estirpes de bactérias e plasmídeos utilizados neste trabalho estão listados na tabela 1.

#### 3.3 Meios de Cultura e Condições de Cultivo

O cultivo de *Escherichia coli* foi feito em meio Luria Broth (LB) ou LA em agitador ou estufa a 30 ou 37<sup>o</sup> C (SAMBROOK et al.,1989). O meio LB apresenta a seguinte composição:

<b>Componentes</b>	<b>Gramas/litro</b>
Extrato de levedura	5,0
Triptona	10,0
NaCl	10,0

Tabela 1 – Estirpes e plasmídeos

Bactéria	Estirpe	Fenótipo/Genótipo	Referência
<i>Streptococcus mutans</i>	UA159 (selvagem)	Spc <sup>S</sup>	AJDIC et al., 2002
<i>Escherichia coli</i>	DH10B	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74 deoR recA1 endA1 araD139 <math>\Delta</math>(<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK</i> <math>\lambda^-</math> <i>rpsL nupG</i></i>	SAMBROOK et al., 1989
	BL21AI	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ) <i>gal dcm araB::T7RNAP-tetA</i>	Invitrogen
	BL21 Codon Plus	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS</i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ) <i>dcm+</i> Tet <sup>r</sup> <i>gal</i> $\lambda$ (DE3) <i>endA</i> Hte [ <i>argU proL</i> ] [ <i>argU ileY leuW</i> Strep/Spec <sup>r</sup> ]	Stratagene
	BL21 pLysS	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , $\lambda$ (DE3), pLysS, Cm <sup>r</sup> .	Promega
<b>Plasmídeos</b>	<b>Fenótipo/Genótipo</b>		
pET28b	Km <sup>R</sup> , vetor de expressão, pT7		Novagen
pET29b	Km <sup>R</sup> , vetor de expressão, pT7		Novagen
GlnRpET28	Km <sup>R</sup> , <i>glnR</i> de <i>S. mutans</i> com cauda His em pET28b		Este trabalho
GlnRpET29	Km <sup>R</sup> , <i>glnR</i> de <i>S. mutans</i> em pET29b		Este trabalho

O meio LA foi obtido após adição de 15 g/L de Agar ao meio LB.

Os antibióticos foram usados nas seguintes concentrações: ampicilina (250µg/mL), estreptomicina (80 µg/mL), canamicina (50 µg/mL), eritromicina (10µg/mL) e tetraciclina (10 µg/mL). As soluções estoque foram preparadas como descrito por Sambrook et al. (1989) e mantidas sob refrigeração a 4°C.

As culturas de *E.coli* foram mantidas em glicerol 50% e estocadas à -20<sup>0</sup> C ou -70<sup>0</sup> C.

O cultivo de *S. mutans* foi feito em meio Todd-Hewitt a 37°C em anaerobiose utilizando jarra Gas-Pack (TODD & HEWITT, 1932). O meio Todd-Hewitt apresenta a seguinte composição:

<b>Componentes</b>	<b>Gramas/litro</b>
Infusão de coração	3,1
Peptona	20,0
Glucose	2,0
NaCl	2,0
Fosfato de sódio	0,4
Carbonato de sódio	2,5

As culturas de *S. mutans* foram mantidas em glicerol 50% e estocadas à -20<sup>0</sup> C.

### 3.4 Manipulação de DNA

As reações de restrição e ligação de DNA, e as técnicas de purificação de DNA foram realizadas conforme descrito por SAMBROOK et al. (1989).

### 3.5 Determinação da Concentração de DNA

A concentração de DNA foi determinada por espectrofotometria medindo absorção a 260nm e 280nm em espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). Uma densidade óptica igual a 1 corresponde a uma concentração de 50µg/mL para DNA dupla fita. O cálculo da razão entre as medidas a 260nm e 280nm permite estimar a pureza dos ácidos nucleicos. Uma preparação pura de DNA apresenta razão 260/280nm de 1,8, valores menores podem indicar contaminação por proteínas e fenol (SAMBROOK et al., 1989).

### 3.6 Transformação gênica

A transformação por eletroporação de estirpes de *E. coli* foi realizada como descrito por SAMBROOK et al. (1989).

### 3.7 Seqüenciamento

#### 3.7.1 Reação de Seqüenciamento de DNA

A reação de seqüenciamento é baseada no processo de incorporação de dideoxynucleotídeos marcados com fluoróforos. Para esta reação foram utilizados DNA purificado, iniciador apropriado e mistura para seqüenciamento Big Dye (Applied Biosystems). A reação foi feita utilizando um termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf). Os parâmetros utilizados foram: um período de desnaturação a 95°C por 2 minutos e 30 ciclos de 60°C por 30 segundos para o anelamento dos primers e 72°C por 2 minutos para extensão do produto de PCR.

#### 3.7.2 Tratamento da Amostra Após Reação de Seqüenciamento

Os produtos das reações de seqüenciamento foram purificados com acetato de amônio 7,5M e etanol 96% na seguinte proporção (20µL de reação de seqüenciamento,

26µL de acetato de amônio e 133µL de etanol), a mistura foi mantida a temperatura ambiente por 10 minutos, sendo centrifugada a 13.000 g por 20 minutos. O DNA precipitado foi lavado duas vezes com etanol 80%, seco à vácuo, ressuspenso em Formamide Loading Dye (Amersham Biosciences) e submetido à eletroforese em Seqüenciador Automático de DNA ABI-PRISM 377 (Applied Biosystems).

### 3.7.3 Edição e Análise das Sequências

As seqüências de nucleotídeos foram analisadas pelo programa BlastX (ALTSCHUL et al., 1997).

### 3.8 Clonagem do gene *glnR* nos vetores de expressão pET28a+ e pET29a+.

O gene *glnR* foi amplificado por PCR (reação em cadeia da polimerase) utilizando como molde o DNA genômico de *S. mutans* UA159 (cedido por Cvitkovitch, Universidade de Toronto, Canadá). Os oligonucleotídeos iniciadores usados foram N-GlnR (5'GAAAGGAGGAAACATATGAAAG 3') e C-GlnR (5'AAAAATTAAGGATCCACGTTACG 3') complementares à região N-terminal e C-terminal de GlnR. Além disso, os iniciadores contém os sítios *NdeI* e *BamHI*, respectivamente. O produto de PCR foi clonado nos vetores pET28b+ e pET29a+ digeridos com as enzimas *NdeI* e *BamHI* gerando os plasmídeos GlnRpET28 e GlnRpET29. O plasmídeo GlnRpET28 expressa a proteína GlnR-His fusionada a uma cauda de poli histidinas que será utilizada para a purificação por cromatografia de afinidade e o plasmídeo GlnRpET29 codifica para a proteína GlnR intacta. Os plasmídeos construídos foram seqüenciados com oligonucleotídeos iniciadores específicos para os vetores pET para verificar a integridade dos genes clonados.

### 3.9 Otimização das condições de indução e solubilização das proteínas GlnR e GlnR-His.

Os plasmídeos GlnRpET28 e GlnRpET29 contendo o gene *glnR* de *S. mutans* foram introduzidos por eletroporação nas estirpes de *E. coli* BL21AI, BL21CodonPlus e BL21pLysS para induzir a expressão de GlnR e GlnR-His, respectivamente. Colônias de

transformantes foram inoculadas em meio LB suplementado com canamicina e a indução da síntese das proteínas foi realizada pela adição de diferentes concentrações de arabinose (0,1%, 0,2% e 0,3%) para a estirpe BL21AI e 0,1mM de IPTG para as duas outras estirpes. As induções foram iniciadas em culturas cuja densidade ótica (600nm) era de 0,4.

Para otimização das condições de expressão aproximadamente 10mL das culturas de *E. coli* em meio LB foram induzidas a 30°C e 37°C e alíquotas de 1mL foram coletadas em intervalos de 1 hora. As alíquotas foram centrifugadas a 5600 g por 5 minutos a 4°C e ressuspensas em 1 mL de tampão de sonicação (50mM Tris HCl pH8,0, 50mM NaCl, 0,1mM EDTA e 10% de glicerol). Após isso, a eficiência da indução foi verificada em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970). Em seguida, as amostras foram tratadas com lisozima (100µg/mL) por 30 minutos e as células foram lisadas em 5 ciclos de sonicação de 45 segundos, ou até a amostra tornar-se translúcida. Após a lise, foi acrescentado coquetel de inibidores de proteases (10µL/mL, SIGMA) e o extrato foi centrifugado a 18000 g durante 30 min a 4°C. O precipitado foi ressuspenso em tampão de sonicação no mesmo volume do sobrenadante. Volumes iguais das frações solúvel (sobrenadante) e insolúvel (precipitado) foram aplicados em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) a 12% para verificar a solubilidade das proteínas GlnR e GlnR-His expressas.

### 3.10 Otimização das condições de purificação da proteína GlnR

Células de um litro de cultura de *E. coli* BL21AI em meio LB foram induzidas a 30°C por 3 horas com 0,2% de arabinose foram coletadas por centrifugação a 5600 g por 5 minutos a 4°C e ressuspensas em 100 mL de tampão de sonicação (50mM Tris HCl, 200mM NaCl, 0,1mM EDTA, 1µg/mL PMSF e 10% de glicerol). Em seguida, a amostra foi tratada com lisozima (100µg/mL) por 30 minutos e as células foram lisadas em 5 ciclos de sonicação de 45 segundos, ou até a amostra tornar-se translúcida. Após a lise, o extrato foi centrifugado a 18000 g durante 30 min a 4°C.

O sobrenadante foi utilizado para a purificação da proteína GlnR. Inicialmente, esta fração foi aplicada em uma coluna de troca iônica Q-Sepharose HiTrap-Q (5mL – GE Healthcare) conectada a um sistema FPLC (Pharmacia). A amostra foi injetada na coluna com um fluxo de 1mL/min. A coluna foi lavada com tampão A (200mM NaCl, 50mM Tris HCl pH 8,0, 0,1mM EDTA, 5% glicerol) até a estabilização da linha de base referente à

absorbância a 280nm. Em seguida, as proteínas adsorvidas à matriz da coluna foram eluídas com um gradiente crescente de concentração de NaCl (200mM a 1M) utilizando tampão B (1M NaCl, 50mM Tris HCl pH 8,0, 0,1mM EDTA, 5% glicerol). As amostras eluídas da coluna foram analisadas por eletroforese em gel de acrilamida desnaturante (SDS-PAGE) a 12%.

As frações eluídas contendo GlnR foram agrupadas e diluídas em tampão de diluição (50mM Tris HCl pH 8,0, 5% glicerol) em volume necessário para a concentração de NaCl chegar a 200mM. Em seguida, a amostra foi aplicada em coluna Hitrap Heparine (5mL – GE Healthcare) pré-equilibrada com tampão A (200mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 8,0, 5% glicerol) conectada ao sistema de FPLC. A amostra foi injetada na coluna ao fluxo de 1mL/min. Em seguida, a coluna foi lavada com tampão A até a estabilização da linha de base. As proteínas foram eluídas com um gradiente de 200mM a 2M de NaCl e fluxo de 1mL/min. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de acrilamida desnaturante (SDS-PAGE) a 12%.

Após este passo as frações contendo GlnR purificada foram agrupadas e dialisadas seqüencialmente com três tampões de diálise com concentrações decrescentes de NaCl. O primeiro tampão continha 500 mM de NaCl, 50mM Tris-HCl pH8,0 e 50% de glicerol. O segundo e o terceiro apresentavam a mesma constituição do primeiro exceto a concentração de NaCl de 300mM e 200mM, respectivamente.

### 3.11 Purificação da proteína GlnR-His

Células de 500mL de cultura de *E. coli* BL21AI em meio LB induzida a 30°C durante 3 horas com 0,2% de arabinose foram coletadas por centrifugação a 5600 g por 5 minutos a 4°C e ressuspensas em 10 mL de tampão de sonicação (50mM Tris-HCl pH8,0, 200mM NaCl, 0,1mM EDTA e 10% de glicerol). Esta amostra foi tratada com lisozima (100µg/mL) por 30 minutos e as células foram lisadas em 5 ciclos de sonicação de 45 segundos, ou até a amostra tornar-se translúcida. Ao extrato foi adicionado PMSF 1µg/mL, e centrifugado a 18000 g durante 30 min a 4°C.

A fração solúvel foi aplicada em uma coluna HiTrap Chelating (1mL – GE Healthcare), ligada ao sistema FPLC, previamente equilibrada com uma solução de 100mM de NiCl<sub>2</sub> e lavada com tampão A (200mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 8,0, 5% glicerol). O sistema foi operado com um fluxo de 1 mL/min e a proteína GlnR-His foi eluída

em um gradiente de 0 a 1M de imidazol utilizando tampão B (200mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 8,0, 1M de imidazol, 5% glicerol). Foram coletadas frações de eluição de 1mL. As frações contendo a proteína purificada foram agrupadas e dialisadas contra o tampão de diálise (200mM de NaCl, 50mM Tris-HCl pH8,0 e 50% de glicerol).

Após as purificações as proteínas GlnR e GlnR-His formavam agregados insolúveis em concentrações maiores ou iguais a 1mM. Verificou-se que a indução a 16°C por 16 horas aumentava a estabilidade destas proteínas após a purificação e diálise. Este método de expressão foi adotado para as purificações seguintes.

### 3.12 Determinação da Concentração de Proteínas

A concentração de proteína foi determinada pelo método de BRADFORD (1976) usando soro albumina bovina como padrão.

### 3.13 Eletroforese de Proteínas

As eletroforeses desnaturantes SDS-PAGE e Tricina-SDS-PAGE foram realizadas conforme LAEMMLI (1970) e SCHÄGGER (2006), respectivamente. As eletroforeses em condições nativas foram realizadas em géis de 6,5% de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 49:1) e corridas em tampão TG50 pH 8,5 (Tris 50mM e glicina 50mM).

### 3.14 Análise da capacidade de ligação ao DNA da proteína GlnR *in vitro*

#### 3.14.1 Amplificação das regiões promotoras dos operons *glnRA* e *amtBglnK*

As regiões promotoras dos operons *glnRA* e *amtBglnK* foram amplificadas por PCR a partir de DNA genômico de *S. mutans* utilizando os oligonucleotídeos pGlnRrev (5' CCGCCATTGATCGTCGAAGC 3') e pGlnRfor (5' GGCCATGAGTAATAAGACGGG 3') ou



pAmtBcons1 (5' AGCTAAGCTTTAGAGCCCTAG 3') e pAmtBcons2 (5' GATAATAAATCGTATAGATCC 3'), respectivamente. Os ciclos de amplificação utilizados foram 95°C por 1 minuto, 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por um minuto e 1 ciclo de 72°C por 15 minutos. O produto de PCR contendo o promotor do operon *glnRA* tem 311 pbs e o fragmento contendo o promotor do operon *amtBglnK* tem 174 pbs.

### 3.14.2 Marcação radioativa do produto de PCR

Os fragmentos de DNA utilizados nos experimentos de retardamento de migração de banda de DNA em gel foram purificados usando o kit de purificação de produtos de PCR QIAquick (Qiagen). Em seguida, foram marcados radioativamente na extremidade 5' utilizando [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (10Ci/mmol, 2mCi/mL 250 $\mu$ Ci, Perkin-Elmer) e T4 polinucleotídeo quinase (Fermentas). O DNA (1 $\mu$ M) foi marcado em reações de 10 $\mu$ L contendo tampão A (50mM Tris-HCl pH 7,6, 10mM de MgCl<sub>2</sub>, 5mM de DTT e 0,1mM de espermidina), 1U de polinucleotídeo quinase, e 3 $\mu$ L de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP. A reação foi incubada durante 30 min a 37°C e 10 min a 72°C.

### 3.14.3 Ensaio de retardamento de migração de banda de DNA em gel

A ligação da proteína GlnR e GlnR-His ao DNA foi avaliada através de ensaios de retardamento de migração de banda de DNA em gel. Nestes experimentos, diferentes concentrações desta proteína foram incubadas com fragmentos de DNA contendo a provável sequência reconhecida pela proteína GlnR dos promotores *amtBglnK* e *glnRA*.

Nestes experimentos concentrações variáveis de DNA e proteína GlnR foram adicionadas ao tampão de ligação (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 8% glicerol, 0.05% *N*-octil glucosídeo, 50  $\mu$ M/mL poli I-C e 100  $\mu$ g/ml BSA). Após a incubação em tampão de reação a 30°C por 20 minutos, as amostras foram aplicadas em géis nativos de poliácridamida a 6,5%. As corridas foram realizadas a 4°C. A intensidade das bandas foi determinada utilizando um aparelho Storm (Molecular Dynamics).

Concentrações variáveis de 2-oxoglutarato, ADP e ATP foram adicionadas ao tampão de ligação quando indicado. Em ensaios com a proteína GlnK e efetores, esta foi incubada na presença dos efetores por 5 minutos antes da adição de GlnR. Apenas quando indicado, os fragmentos de DNA foram adicionados às misturas de ligação após a incubação das proteínas e efetores por 5 minutos.

Nos ensaios de competição foram utilizados fragmentos de DNA marcados radioativamente contendo os promotores dos operons *glnKamtB* e *glnRA* de *S. mutans* em concentração fixa de 1,44nM. Foram adicionados à reação de ligação produtos de PCR contendo os mesmos promotores nas concentrações de 1,44nM, 14,4nM e 144nM. Em alguns experimentos foram utilizadas concentrações variáveis da proteína GlnK de *S. mutans*, 2,5mM de ADP e ATP e 5mM de 2-oxoglutarato.

A proteína GlnK de *S. mutans* foi gentilmente cedida por Portugal (2006).

Nos experimentos em que os géis foram corados com Sybr Green, foi utilizado apenas DNA não marcado e não foi adicionado poli (I·C) às reações. O Sybr Green é um reagente que se liga com alta afinidade ao DNA dupla fita. Com transiluminação de 300nm podem ser detectados 60pg de DNA.

### 3.15 Experimento de co-precipitação de GlnR e GlnK-His

A formação de complexos entre GlnR e GlnK-His *in vitro* foi estudada utilizando ensaios de co-precipitação ou “pull-down”. Nestes ensaios as proteínas GlnR e GlnK-His foram incubadas em tampão A (10mM Tris-HCl pH 8,0, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 8% de glicerol, 0,05% de N-octil glucosídeo, e 80mM de imidazol) na presença ou ausência de DNA (25nM) e prováveis efetores de GlnK (ADP, ATP e 2-oxoglutarato) a temperatura ambiente. O imidazol foi utilizado no tampão A para evitar interações inespecíficas entre as proteínas testadas e a resina. Para 50µL de resina Ni<sup>+2</sup>-chelating Sepharose (GE Healthcare) equilibrada com tampão A, foram adicionados 15µg de GlnK-His. Após 5 minutos foram adicionados 7,5µg de GlnR. As misturas de reação foram incubadas 15 minutos e, em seguida, centrifugadas por 1 minuto para coletar a resina ligada às proteínas. A resina foi então lavada três vezes com 200µL de tampão A contendo ou não DNA e efetores. As proteínas foram eluídas com tampão B (10mM Tris pH 8,0, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 8% de glicerol, 0,05% de N-octil glucosídeo e 1M de imidazol). Em experimentos controle, somente GlnK-His ou GlnR foram adicionadas à resina em tampão A. As amostras foram analisadas em géis Tricina SDS-PAGE a 10% corados com Coomassie Blue coloidal (KANG et al., 2002).

As bandas tiveram sua intensidade avaliada através do programa LabWorks (BioImaging Systems).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Análise estrutural da proteína GlnR de *S. mutans*.

A proteína GlnR de *S. mutans* é composta por 123 resíduos de aminoácidos e apresenta massa molecular de 14.308,4 Da. Seu *pI* teórico é de 9,64. A predição de estrutura secundária resultou na identificação de uma alta incidência de alfa-hélices (58,54% dos resíduos) (Figura 6). Através do alinhamento da seqüência de aminoácidos da proteína GlnR de *S. mutans* com a seqüência da proteína GlnR de outros microrganismos observa-se que a proteína tem a seqüência altamente conservada na região N-terminal, sendo a região C-terminal mais variável (Figura 7).

A busca por domínios funcionais resultou no alinhamento da região N-terminal de GlnR, do resíduo 13 ao 81, com um motivo hélice-volta-hélice (HTH) de ligação ao DNA. Este domínio também foi identificado no modelo estrutural teórico de GlnR, o qual apresenta alta similaridade estrutural com a região N-terminal da proteína MerR de *Streptomyces lividans* (arquivo PDB: 2VZ4) (Figuras: 8 e 9). Nenhum domínio funcional foi identificado na região C-terminal de GlnR. Entretanto, esta região apresenta homologia estrutural com modelos de duas proteínas recentemente depositados no banco de dados de estruturas de proteínas – RCSB: um provável regulador transcricional de *Listeria monocytogenes* (arquivo PDB: 3GP4) e um ativador transcricional da família MerR de *Bacillus thuringiensis* (arquivo PDB: 3GPV).

O alinhamento das seqüências de aminoácidos das proteínas GlnR de *S. mutans* e de *B. subtilis* mostra que a região de interação com DNA está totalmente conservada (Figura 10), sugerindo que as duas proteínas reconheçam a mesma seqüência de nucleotídeos.

A interação entre as proteínas GlnK e TnrA de *B. subtilis* está bem descrita (HEINRICH et al., 2006). Entretanto, a região de TnrA envolvida nessa interação é desconhecida. O alinhamento das seqüências de aminoácidos das proteínas GlnR de *S. mutans* e TnrA de *B. subtilis* (Figura 11) mostra uma alta similaridade de seqüências entre as duas proteínas, principalmente na região N-terminal. A comparação entre os modelos estruturais teóricos destas proteínas sugere que elas apresentam estruturas semelhantes o que pode indicar que GlnR possua uma região responsável pela interação com GlnK similar à de TnrA (Figura 12).



Figura 7: Alinhamento de proteínas de *S. mutans* e diversos microrganismos

```

Enterococcus_faecalis      -----
Enterococcus_gallinarum    -----
Listeria_monocytogenes     -----
Streptococcus_pneumoniae   -----
Streptococcus_mutans       -----
Lactococcus_lactis         -----
Lactobacillus_rhamnosus    -----
Bacillus_subtilis          -----
Staphylococcus_aureus      -----
Mycobacterium_vanbaalenii  -----MGDTPRQEELDLTGSSPQDPF-----LPRVV 26
Mycobacterium_leprae       MTHLVTRARSARGNTVSEQPRQGQLDLADYRDTPTATTHGDI GLNGPTAV 50
Corynebacterium_diphtheriae -----MEEMRDND----- 8

Enterococcus_faecalis      -----MREKELRRSMSVFPIGIVMKLTLTARQIRYYEEQG LIHP-- 40
Enterococcus_gallinarum    -----MREKELRRSMSVFPIGIVMKLTLTARQIRYYEEQELIHP-- 40
Listeria_monocytogenes     -----MSEKEIRRSMP LFPIGIVMKLTLTARQIRYYEDQG LIHP-- 40
Streptococcus_pneumoniae   -----MKEKEFRNRMAVFPIGIVMKLTLTARQIRYYEDQELIKP-- 40
Streptococcus_mutans       -----MKEKELRRSMVFPIGIVMKLTLTARQIRYYEDQGLLTP-- 40
Lactococcus_lactis         -----MVKERELRRSMVLP IGV MKLTLTARQIRYYEEQELIFP-- 41
Lactobacillus_rhamnosus    -----MAEIALRTRSVLP IGV MLLTLTARQIRYYETQGLVKP-- 40
Bacillus_subtilis          -----MSDN-IRRSMP LFPIGIVMQLTEL SARQIRYYEENGLIFP-- 39
Staphylococcus_aureus      -----MISNDAIRRNMAVFSMSVSKLTLTPRQIRYYETHELIKP-- 41
Mycobacterium_vanbaalenii  AEPVQAGLFPDDSVDELVGYRGPSACQIAGITYRQLDYWARTSLVVP SI 76
Mycobacterium_leprae       SGPAQPG LFPDDSVDELVGYRGPSACQIAGITYRQLDYWARTSLVVP SI 100
Corynebacterium_diphtheriae -VFVQQALF--DMGPFDEEVGYRVPIACQVAGITYRQLDYWARTKLVEPTI 55
      .      .      :: :: **: *: *: *

Enterococcus_faecalis      --ERSEGNRRMYSLNIDIVLLEIKDYLS DGLNMAGIKRVYEMK---LEE Q 85
Enterococcus_gallinarum    --ERSDGNRRMYSLNIDITLLEIKDYLS DGLNMAGIKRVYEMK---IAKE 85
Listeria_monocytogenes     --ARNQGNHRLYS LQDIDVLEIKDYLN DGLNIAIGIKMYQM---QKES 85
Streptococcus_pneumoniae   --DRNEGNRRMYSLN DMDRLLEIKDYISEGYNIAAIKKKYAER---EAKS 85
Streptococcus_mutans       --DRSSGNRRMYSLN DMDVLEIKDFLDEGLNIAAIKREYADRKDRALKK 88
Lactococcus_lactis         --ERSDGNRRMYSLNIDIALFDIADLLQEGNNIADIKEIYAKR---DAKK 86
Lactobacillus_rhamnosus    --QRNAGNHRTYS LNDVDELLEIRSQMADGFTLADVKRLKHPR---HRE 84
Bacillus_subtilis          --ARSEGNRR LFSFHDVDKLEIKHLIEQGVNMAGIKQILAKAEAEPEQK 87
Staphylococcus_aureus      --ERTEGQKRLFS LNDLERLLEIKS LLEKGFNIKGIKQI IYDS----QE 84
Mycobacterium_vanbaalenii  RGAAGSGSQRLYSFKDILVLKIVKRLLDTGISLHNIRVAVDHLRQGVQD 126
Mycobacterium_leprae       RGAAGSGSQRLYSFKDILVLKIVKRLLDTGISLHNIRVAVDHLRQGVQD 150
Corynebacterium_diphtheriae RTARGSGSQRLYSFKDILVLKIVKRLLDTGISLQNI RLAVDKLRNRGVDD 105
      *.:* :*: : * : : * : : :

Enterococcus_faecalis      KN---TAEATRPLTDADVRQILYDEILSQGGLT-QQNPFQ-SNVPR L--- 127
Enterococcus_gallinarum    Q---EAKNKPPLTDEDVRRIFYDELLAQGGLN-QQQPFQ-QKGPLM--- 126
Listeria_monocytogenes     K-----EPLTDDVVKILRKEMQQAGRFV-KQDATGKQQLPRF--- 122
Streptococcus_pneumoniae   K-----KAVSQTEVRRALHNELLQQGRFA-SVQ-SPFG--RG--- 118
Streptococcus_mutans       Q-----KALTADVRRILHDELNRNQGRFS-SPT-QHLGGLRM---- 123
Lactococcus_lactis         A-----QTLSIGEVHHALEREFAQQGRFG-TFNPTHTFTQPRM--- 122
Lactobacillus_rhamnosus    D-----SDAEVRKVL RDELLNQSR LNQSPDPGPFVIGFRQSH-- 120
Bacillus_subtilis          QNEKTKKPMKHDLS DDEL RQLLNELMQAGRFQRGNTFRQGDMSRFFH-- 135
Staphylococcus_aureus      H-----LTIDEQEI RKKMIVDATQK-PIGETLPINRGDL SRFIK-- 122
Mycobacterium_vanbaalenii  LANITLFS DGTTVYECTSAEEVVDLLQGGQGVFGIAVSGAMREL TGA IAD 176
Mycobacterium_leprae       LANITLFS DGTTVYECTSAEEVVDLLQGGQGVFGIAVSGAMREL TGVIDD 200
Corynebacterium_diphtheriae LAEITLVS DGTTVYECRSNEEVIDLLGGGQGVFGIAVP GIVREL TGTISS 155

```

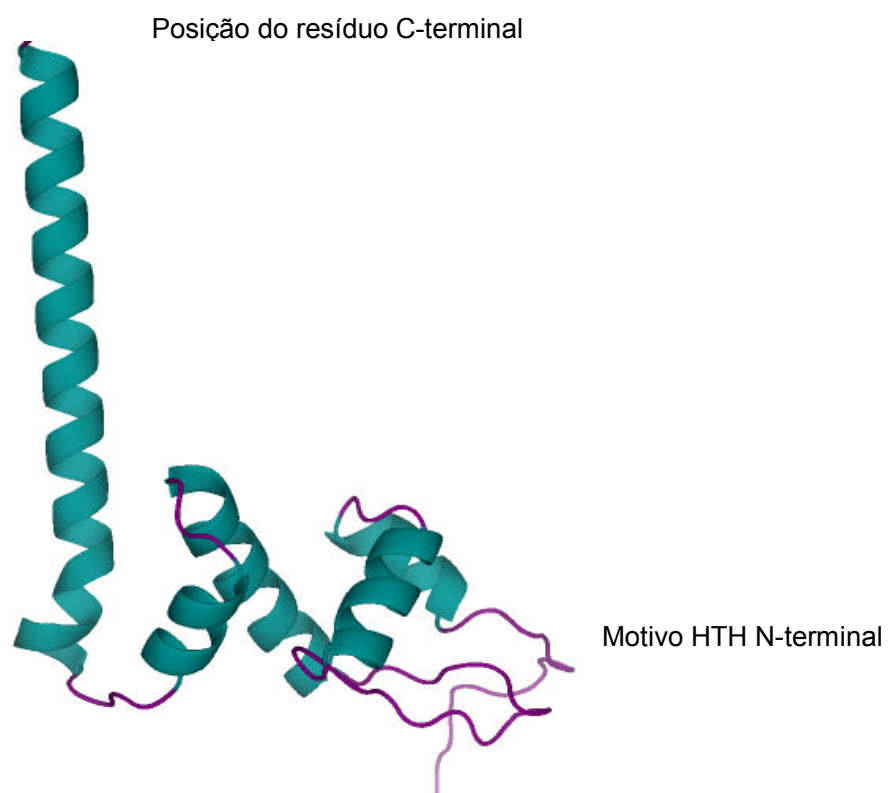
```

Enterococcus_faecalis      -----
Enterococcus_gallinarum    -----
Listeria_monocytogenes     -----
Streptococcus_pneumoniae   -----
Streptococcus_mutans       -----
Lactococcus_lactis         -----
Lactobacillus_rhamnosus    -----
Bacillus_subtilis          -----
Staphylococcus_aureus      -----
Mycobacterium_vanbaalenii  FPGERADGGESISAPE---DELASRRKSDRKIG 207
Mycobacterium_leprae       FRGERADGGESIAAPE---DELASRRKHDRKIG 231
Corynebacterium_diphtheriae FPSEKISDFLSNSPAAGGIDELAARLRKTS--- 186

```

O alinhamento foi gerado pelo programa Clustal W, aminoácidos idênticos são indicados por asteriscos, as substituições por aminoácidos de alta similaridade são indicadas por dois pontos e as substituições por aminoácidos de baixa similaridade são indicadas por um ponto. As seqüência de aminoácidos utilizadas foram retiradas do banco de dados GenBank.

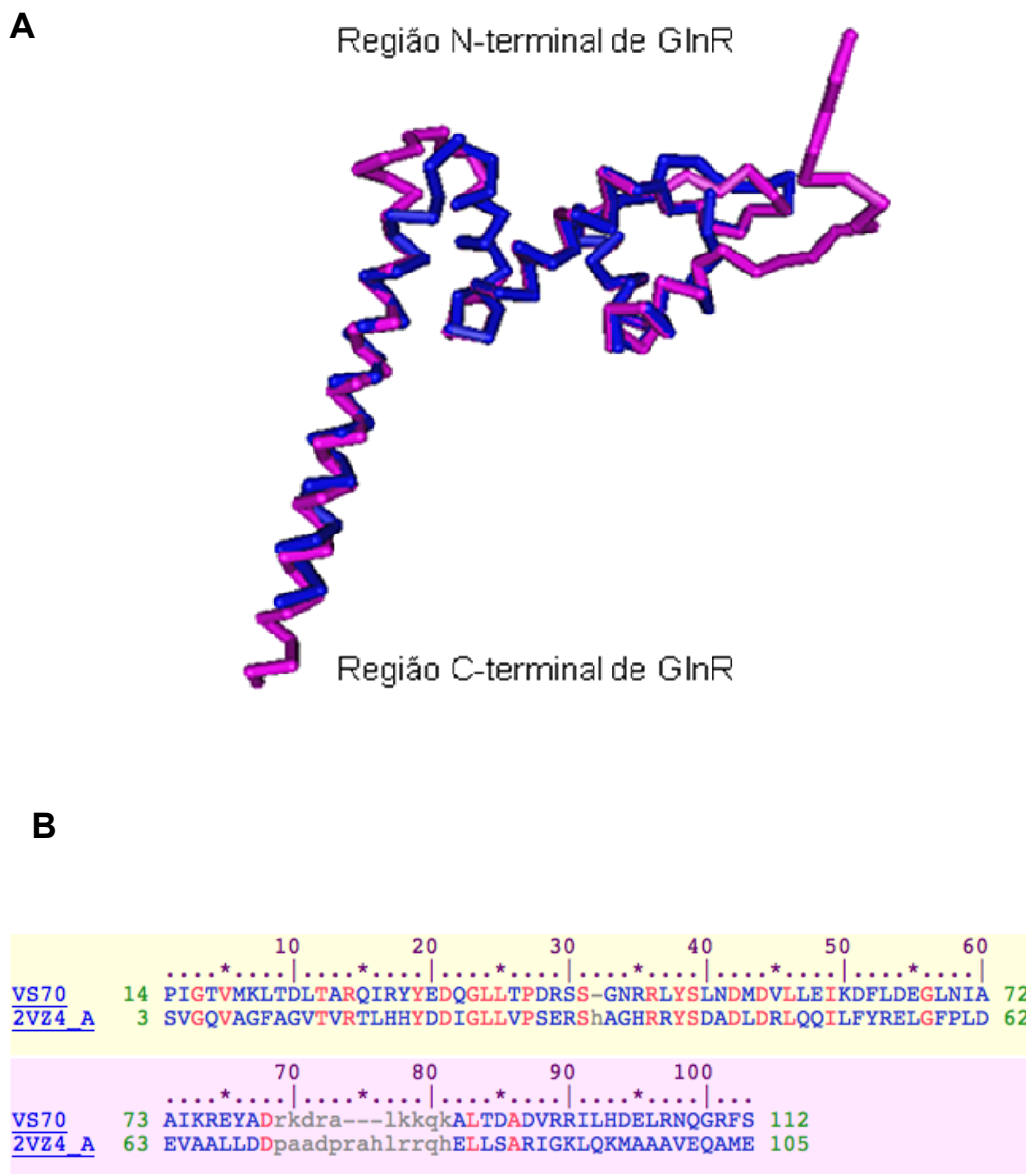
Figura 8: Modelo estrutural teórico da proteína GlnR de *S. mutans*



Modelo estrutural teórico da proteína GlnR mostrando o domínio hélice-volta-hélice na região N-terminal.



Figura 9: Alinhamento estrutural e de seqüências de aminoácidos da proteína GlnR de *S. mutans* com a proteína MerR de *Streptomyces lividans*.



Alinhamento estrutural da seqüência de aminoácidos da proteína GlnR de *S. mutans*. (A) Alinhamento do modelo estrutural teórico da proteína GlnR de *S. mutans* (rosa) com o modelo estrutural do domínio N-terminal da proteína MerR de *Streptomyces lividans* (azul). (B) Alinhamento da seqüência de aminoácidos da proteína GlnR de *S. mutans* (VS70) com a seqüência da região N-terminal da proteína MerR de *Streptomyces lividans* (2VZ4\_A). Resíduos conservados estão representados em vermelho. A similaridade entre as seqüências é de 42%.

Figura 10: Alinhamento das proteínas GlnR de *S. mutans* e *B. subtilis*

```

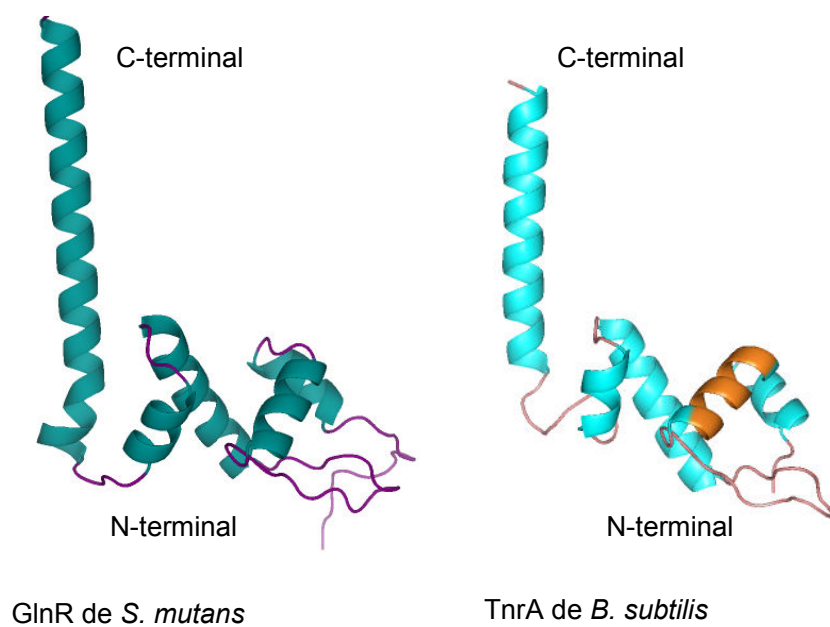
Streptococcus_mutans  MKEKELRRSMAVFPIGIVMKLTDLTARQIRYYEDQGLLTPDRSSGNRLYSLNMDVILE 60
Bacillus_subtilis     MSDK-IRRSMPPLFPIGIVMQLTELSARQIRYYEENGLVFPARSEGNRLFSFHDVDKLE 59
                        *.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*
Streptococcus_mutans  IKDFLDEGLNIAAIKREYA-----DRKDRALKKQK-ALTDADVRRILHDELRNQGRF 111
Bacillus_subtilis     IKDLIEQGVNMAGIKQIFAKIENEQKEDKQDKPKKAETHNLSDEELRKLLKNELIQGRF 119
                        ***:::.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*
Streptococcus_mutans  SSPTQHLGG--LRM-- 123
Bacillus_subtilis     QRGITFRQGDMSRFFH 135
                        . * . * *

```

O alinhamento foi gerado pelo programa Clustal W, aminoácidos idênticos são indicados por asteriscos, as substituições por aminoácidos de alta similaridade são indicadas por dois pontos e as substituições por aminoácidos de baixa similaridade são indicadas por um ponto. Os resíduos importantes para a interação com DNA estão destacados. A similaridade entre as seqüências é de 72%.



Figura 12: Comparação de modelos estruturais teóricos das proteínas GlnR de *S. mutans* e TnrA de *B. subtilis*



Modelos estruturais teóricos das proteínas GlnR de *S. mutans* e TnrA de *B. subtilis*. A hélice  $\alpha 2$  de TnrA, responsável pela ligação ao DNA, está representada na cor alaranjada.

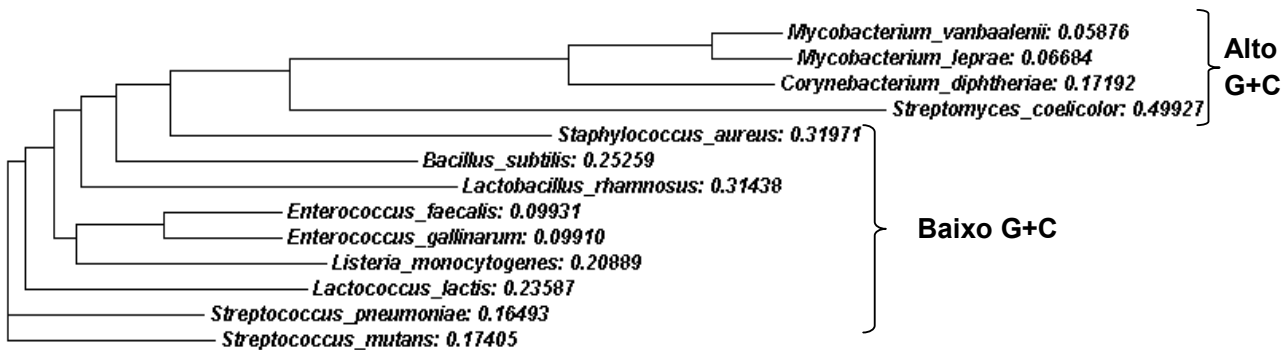
Uma árvore filogenética com seqüências de GlnR de diferentes microrganismos foi construída utilizando o programa ClustalW (Figura 13). Nesta árvore, as seqüências de GlnR aparecem divididas em dois subgrupos, um composto por proteínas GlnR de bactérias gram-positivas com alto teor de G+C e outro composto por proteínas de bactérias com baixo teor de G+C. As proteínas do segundo grupo apresentam cerca de 100 a 120 resíduos de aminoácidos e pertencem à família MerR, as do primeiro grupo são maiores e pertencem à outras famílias de reguladores transcricionais.

#### 4.2 Clonagem do gene *glnR* nos vetores de expressão pET28a+ e pET29a+

O gene *glnR* foi amplificado em uma reação de PCR na presença dos oligonucleotídeos iniciadores N-GlnR e C-GlnR (Figura 14). Estes oligonucleotídeos iniciadores continham seqüências reconhecidas pelas enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*. Estas enzimas foram utilizadas para digerir o produto de PCR e os vetores de expressão pET28a+ e pET29a+. Os fragmentos de DNA resultantes da digestão foram ligados dando origem aos plasmídeos GlnRpET28 e GlnRpET29. A integridade dos clones foi confirmada por seqüenciamento utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para os vetores pET.

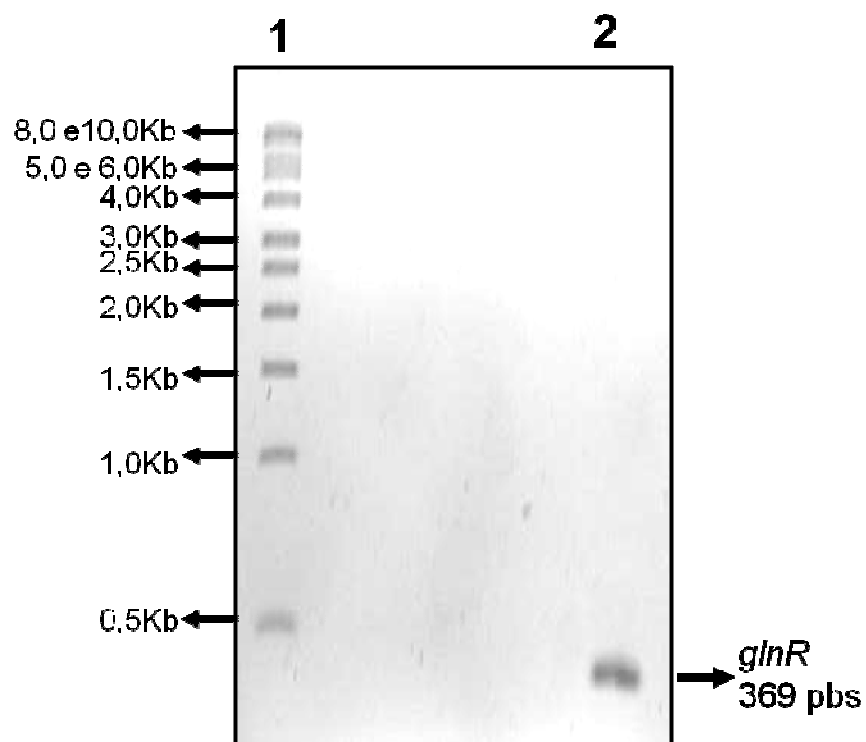
O plasmídeo GlnRpET28 expressa a proteína GlnR-His, que contém uma cauda de histidinas fusionada à região N-terminal. O plasmídeo GlnRpET29 expressa a proteína GlnR nativa.

Figura 13: Árvore filogenética de proteínas regulatórias do metabolismo de nitrogênio.



A árvore filogenética foi construída usando o programa ClustalW com a função de correção de distâncias evolutivas. A distância evolutiva é proporcional ao comprimento das linhas. Os números indicam substituições por resíduo de aminoácido.

Figura 14: Amplificação do gene *glnR* de *S. mutans* por PCR



Eletroforese em gel de ágar 1% do produto de reação amplificação do gene *glnR* de *S. mutans* utilizando os oligonucleotídeos N-GlnR e C-GlnR. 1- marcador de massa molecular (1Kb Ladder - Sigma); 2-produto de amplificação a partir do DNA genômico de *S. mutans*. O gel foi corado com brometo de etídio.

#### 4.3 Determinação das condições de indução e solubilidade das proteínas GlnR e GlnR-His

##### 4.3.1 Determinação do tempo de indução da superexpressão da proteína GlnR

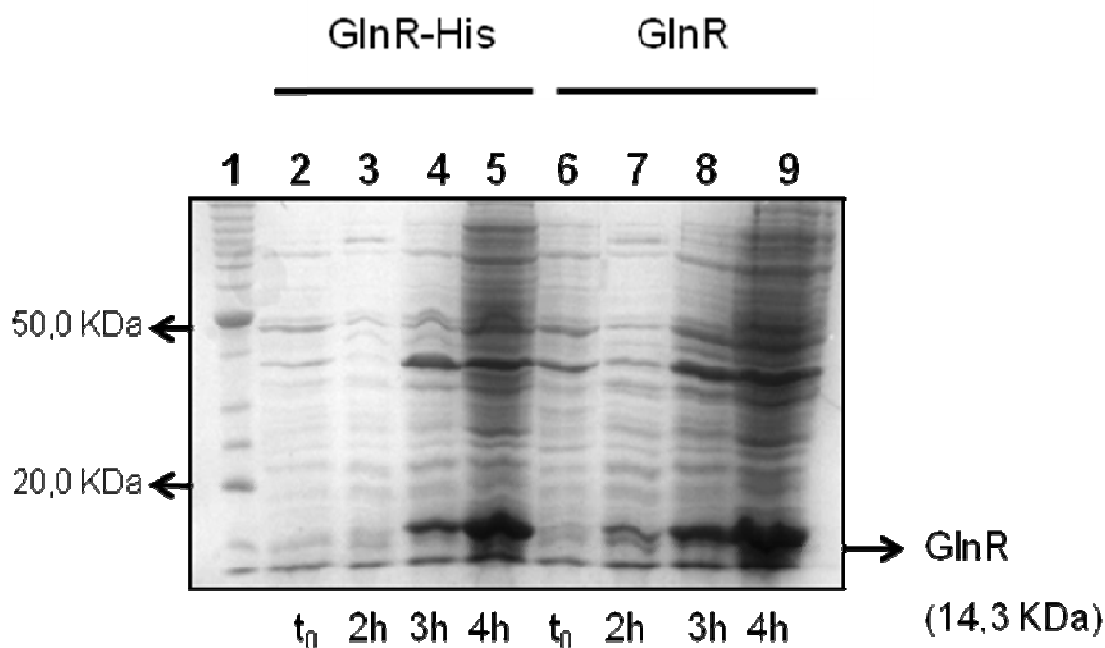
Os plasmídeos GlnRpET28 e GlnRpET29 foram introduzidos por eletroporação em células de *E. coli* estirpe BL21AI. Estas culturas foram induzidas a 37°C com 0,2% de arabinose. Alíquotas de 1 mL destas culturas foram retiradas nos tempos de 0, 2, 3 e 4 horas. Estas amostras foram preparadas conforme descrito no item 3.8 e a eficiência da síntese das proteínas GlnR e GlnR-His foi avaliada por SDS-PAGE. A figura 15 mostra que quantidade de proteínas sintetizadas aumentou com o tempo. O extrato da cultura induzida por 3 horas apresentou menor quantidade de proteínas contaminantes em relação à quantidade de GlnR. Assim, este tempo de indução foi utilizado para o preparo das células para a purificação das proteínas de interesse.

##### 4.3.2 Solubilidade da proteína GlnR de *S. mutans*

Culturas de BL21AI contendo os plasmídeos GlnRpET28 e GlnRpET29 induzidas durante 3 horas a 37°C foram coletadas e lisadas conforme descrito no item 3.8. Nestas condições, 100% das proteínas GlnR e GlnR-His encontravam-se na fração insolúvel (Figura 16). A fim de aumentar a solubilidade das proteínas GlnR e GlnR-His, foram testadas variações na temperatura de indução, estirpe hospedeira e concentração de indutor.

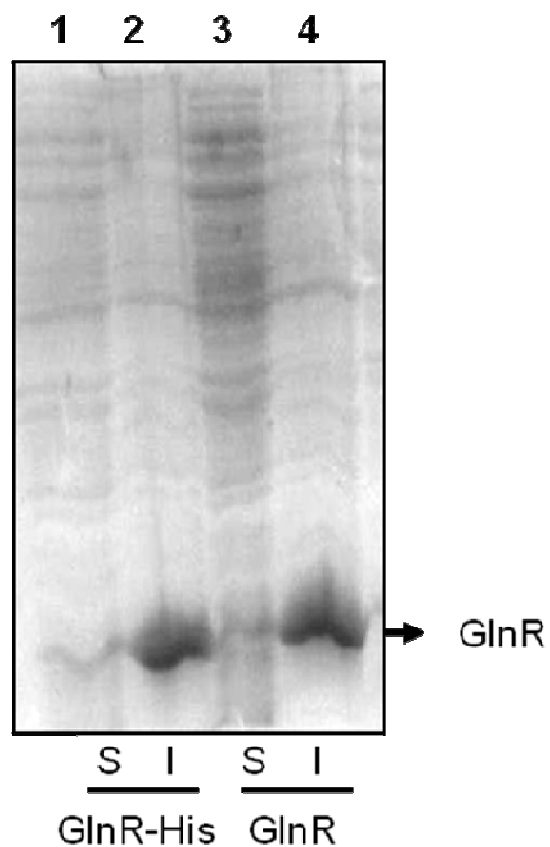


Figura 15: Efeito do tempo de indução na síntese das proteínas GlnR e GlnR-His na estirpe de *E.coli* BL21 A1 cultivadas a 37°C



Eletroforese em SDS-PAGE 12% de extratos de células BL21AI transformadas com os plasmídeos GlnRpET28a e GlnRpET29a induzidas na presença de arabinose 0,2%. Linha 1: marcador de massa molecular (Page Ruler Unstained Protein Ladder - Fermentas). Linhas 2 a 5: Tempos de indução de 0, 2, 3 e 4 horas na presença do plasmídeo GlnRpET28. Linhas 6 a 9: Tempos de indução de 0, 2, 3 e 4 horas na presença do plasmídeo GlnRpET29. A seta indica as proteínas superexpressas. As proteínas foram coradas com Coomassie Blue.

Figura 16: Solubilidade das proteínas GlnR e GlnR-His sintetizadas nas estirpe BL21A1 a 37°C



Eletroforese em SDS-PAGE 12% contendo extratos de células BL21A1 induzidas com 0,2% de arabinose a 37°C por 3 horas. S indica fração solúvel e I indica fração insolúvel. Linha 1 e 2: extrato de *E. coli* BL21A1 contendo o plasmídeo GlnRpET28. Linhas 3 e 4: extrato de *E. coli* BL21A1 contendo o plasmídeo GlnRpET29. As proteínas foram coradas com Coomassie Blue.

#### 4.3.3 Efeito da temperatura de indução na síntese da proteína GlnR

Células da estirpe BL21AI contendo os plasmídeos GlnRpET28 e GlnRpET29 foram cultivadas a 37°C até atingirem a D.O.<sub>600</sub> de 0,4. As culturas foram divididas em frascos e encubadas a 30°C e a 37°C e foi iniciada a indução com 0,2% de arabinose durante 3 horas. Em seguida, as células foram tratadas como descrito no item 3.8 e a solubilidade das proteínas foi analisada por SDS-PAGE (Figura 17). Os resultados mostraram que a indução na temperatura de 30°C aumenta a solubilidade das proteínas GlnR e GlnR-His.

#### 4.3.4 Efeito da estirpe hospedeira na eficiência de síntese da proteína GlnR

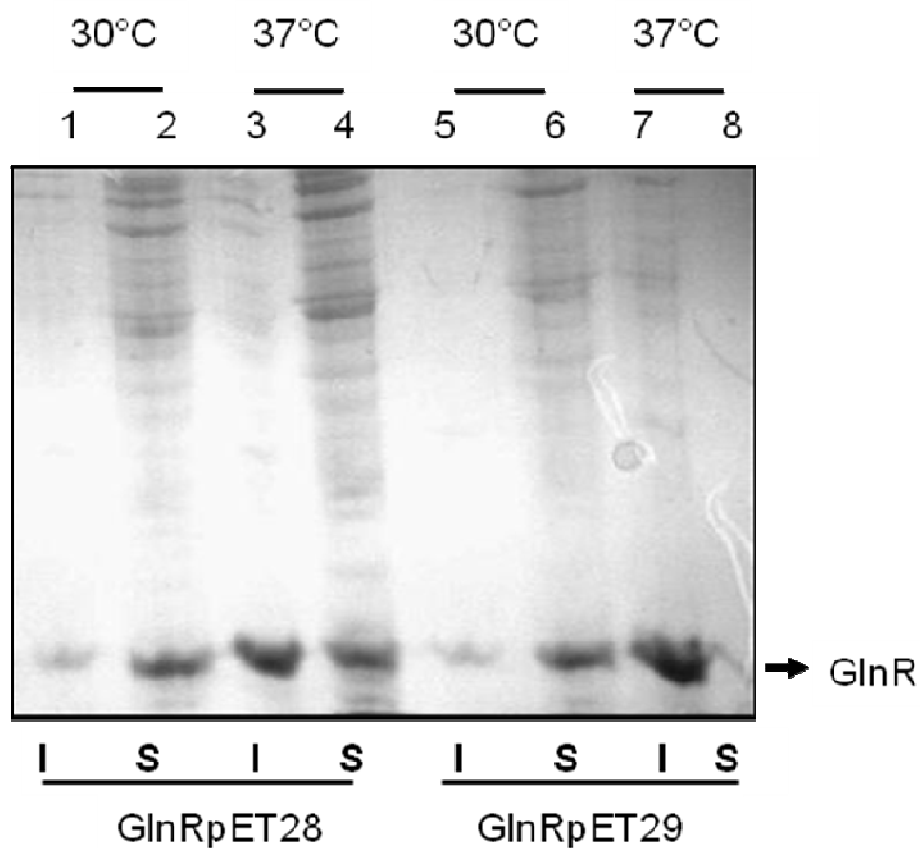
As estirpes de *E. coli* BL21AI, BL21pLysS e BL21CodonPlus foram transformadas com os plasmídeos GlnRpET28 e GlnRpET29. Estas células foram cultivadas e a expressão das proteínas foi induzida com 0,2% de arabinose na primeira estirpe e 0,1mM de IPTG nas demais. As células foram coletadas por centrifugação, lisadas e centrifugadas para verificar o nível de síntese e a solubilidade de GlnR e GlnR-His nas diferentes estirpes (Figuras 18 e 19).

Nas estirpes BL21AI e BL21pLysS, tanto o nível de síntese quanto a solubilidade da proteína GlnR foram semelhantes (Figura 18). O nível de síntese da proteína GlnR-His a partir do plasmídeo GlnRpET28 foi maior na estirpe BL21AI do que na estirpe BL21CodonPlus (Figura 19). Por este motivo, a estirpe BL21AI foi selecionada para os experimentos seguintes.

#### 4.3.5 Efeito da concentração de indutor na eficiência de síntese da proteína GlnR

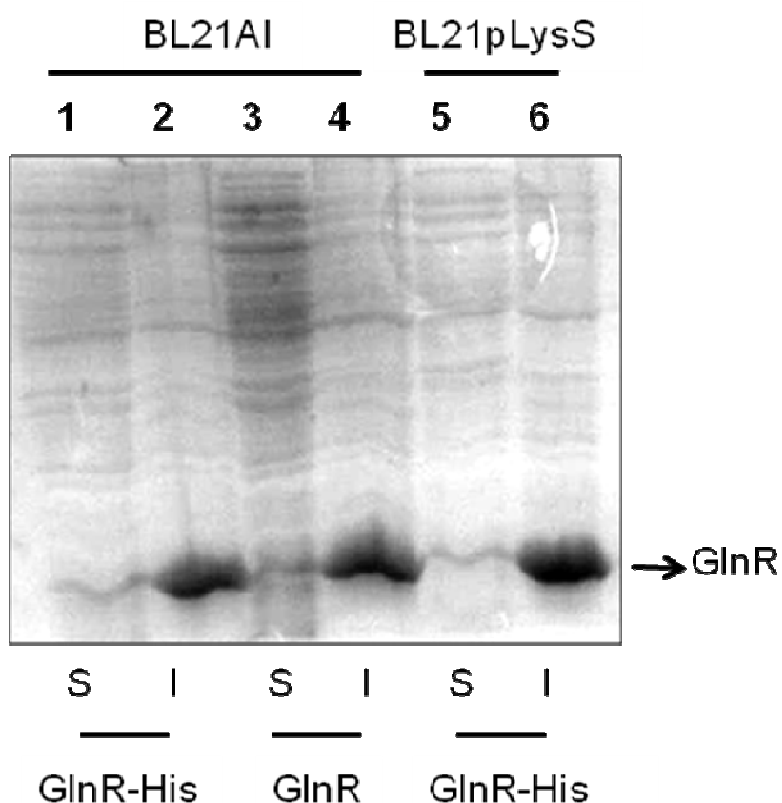
Na estirpe BL21AI a expressão do gene da T7 RNA polimerase ocorre a partir do promotor do operon *araBAD*. Assim, a expressão a partir do promotor T7 dos plasmídeos é regulada pela concentração de arabinose no meio. Esta é uma vantagem para a síntese de proteínas tóxicas para *E. coli*, pois permite regular o nível de expressão pela concentração de arabinose utilizada.

Figura 17: Efeito da temperatura de indução na solubilidade das proteínas GlnR e GlnR-His



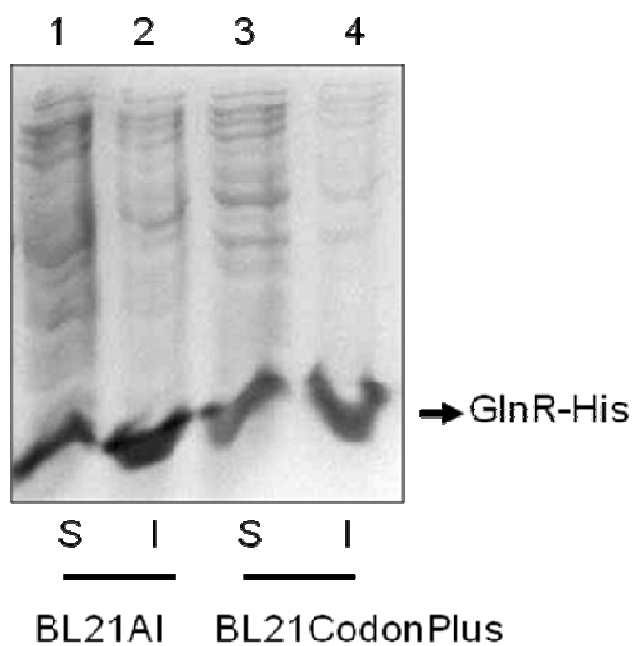
Eletroforese em SDS- PAGE (12%) de extratos de células BL21AI induzidas com 0,2% de arabinose. S indica fração solúvel e I indica fração insolúvel. As linhas 1, 2, 5 e 6 correspondem a extratos induzidos na temperatura de 30°C e as linhas 3, 4, 7 e 8 a extratos induzidos à 37°C. As proteínas foram coradas com Coomassie Blue.

Figura 18: Efeito das estirpes hospedeiras sobre a solubilidade de GlnR e GlnR-His



Eletroforese em SDS-PAGE 12% de extratos de células induzidas na temperatura de 37°C. S indica fração solúvel e I indica fração insolúvel. Linhas 1 e 2: Extratos de células BL21AI x GlnRpET28 induzidas com 0,2% de arabinose. Linhas 3 e 4: Extratos de células BL21AI x GlnRpET29 induzidas com 0,2% de arabinose. Linhas 5 e 6: Extratos de células BL21pLysS x GlnRpET29 induzidas com 0,1mM de IPTG. As proteínas foram coradas com Coomassie Blue.

Figura 19: Efeito das estirpes hospedeiras sobre a solubilidade de GlnR-His



Eletroforese em SDS-PAGE 12% de extratos de células induzidas na temperatura de 30°C. S indica fração solúvel e I indica fração insolúvel. Linhas 1 e 2: Extratos de células BL21AI x GlnRpET28 induzidas com 0,2% de arabinose. Linhas 3 e 4: Extratos de células BL21CodonPlus x GlnRpET28 induzidas com 0,1mM de IPTG. As proteínas foram coradas com Coomassie Blue.

O efeito da concentração de indutor sobre a solubilidade de GlnR e GlnR-His foi avaliado. Inicialmente, culturas de células contendo os plasmídeos de interesse foram induzidas com 0,1, 0,2 e 0,3% de arabinose durante 3 horas. Neste experimento não foi possível estabelecer uma relação entre a concentração de indutor e a solubilidade das proteínas (Figura 20). A concentração de 0,2% de arabinose foi utilizada para os experimentos seguintes.

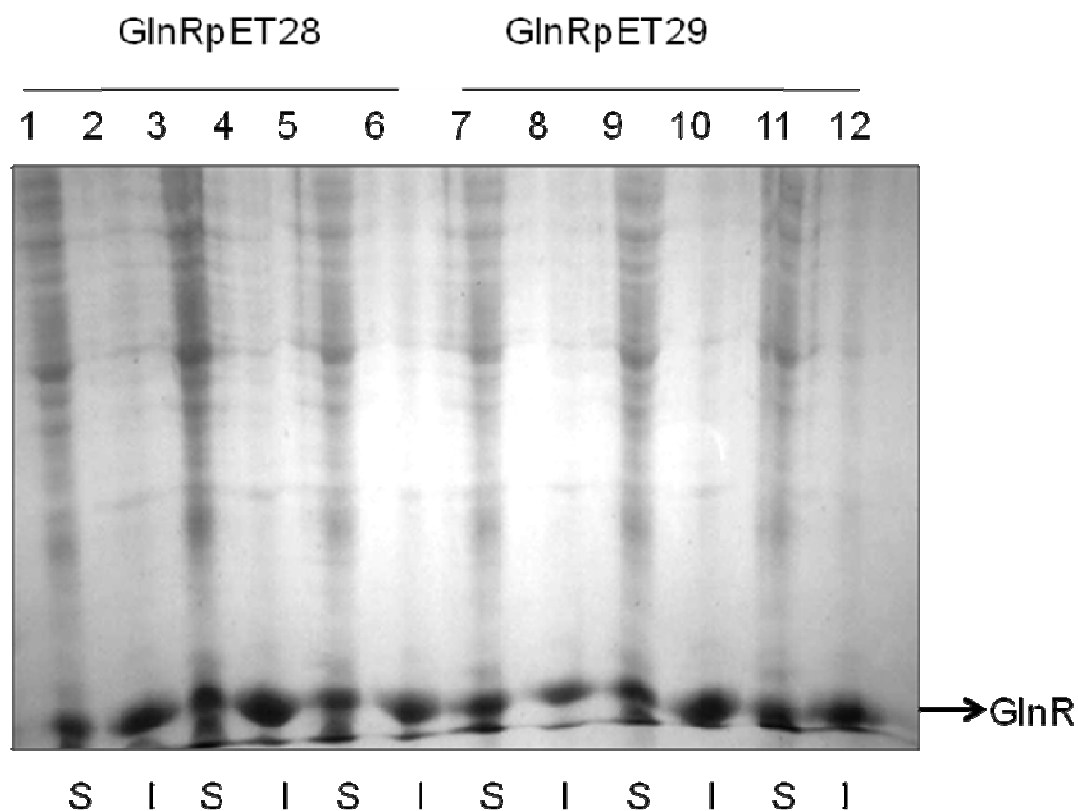
#### 4.4 Purificação da proteína GlnR

A proteína GlnR foi expressa em *E. coli* estirpe BL21AI, a 30°C durante 3 horas após a adição de arabinose a 0,2%. A purificação foi feita em dois passos cromatográficos. Células de um litro de cultura foram coletadas e ressuspensas em tampão de sonicação (200mM NaCl, 50mM Tris HCl pH 8,0, 0,1mM EDTA, 1µg/mL PMSF e 10% glicerol). Após a lise, o extrato foi centrifugado e a fração solúvel foi utilizada para a purificação. A amostra foi injetada na coluna HiTrap-Q de 5mL (GE) e o volume de injeção foi coletado. Como esta é uma coluna de troca aniônica e em pH 8,0 GlnR está carregada positivamente, esta proteína não interage com a resina sendo eluída durante a injeção. Entretanto, este passo cromatográfico foi mantido porque muitas das proteínas contaminantes ligavam-se à coluna resultando numa considerável purificação da proteína de interesse.

No segundo passo cromatográfico da purificação, a fração coletada durante a injeção da amostra na coluna HiTrap-Q (5mL) foi aplicada numa coluna HiTrap-Heparine (5mL). A proteína GlnR ligou-se fortemente à resina, sendo eluída a partir da concentração de 1,3M de NaCl. As frações que apresentaram o maior grau de pureza foram reunidas e dialisadas seqüencialmente contra três tampões de diálise com concentrações decrescentes de NaCl como descrito na seção Material e Métodos item 4.8. Após as duas etapas de purificação a proteína apresentou alto grau de pureza, calculado em 95% por análise densitométrica em SDS-PAGE corado com Coomassie Blue (Figura 21). O rendimento a partir de 74,4mg de proteínas presentes na fração solúvel foi de 0,39mg ou 0,51%.

#### 4.5 Purificação da proteína GlnR-His

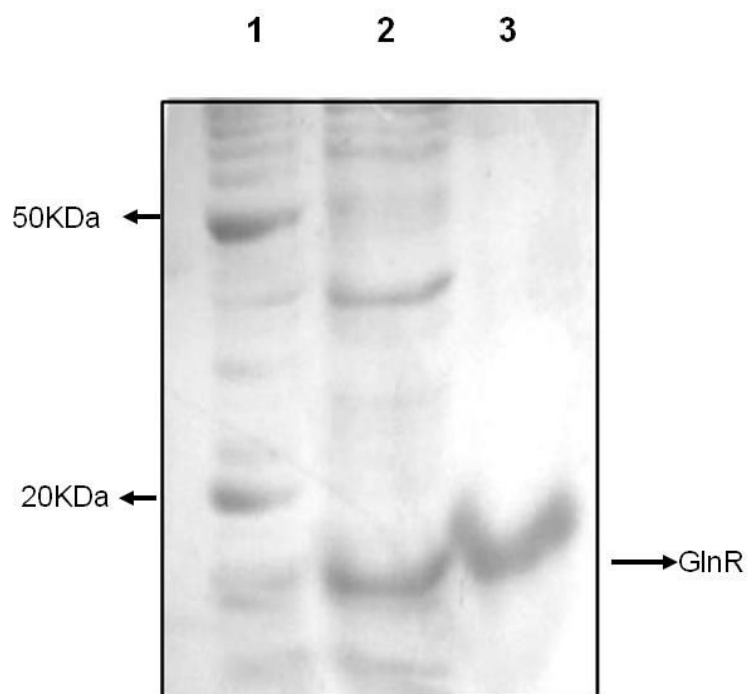
Figura 20: Efeito da concentração de indutor sobre a solubilidade de GlnR e GlnR-His



Eletroforese em SDS-PAGE 12% dos extratos de células BL21AI induzidas com arabinose na temperatura de 30°C. S indica fração solúvel e I indica fração insolúvel. Linhas 1, 2, 7 e 8: Extratos de células induzidas com 0,1% de arabinose. Linhas 3, 4, 9 e 10: Extratos de células induzidas com 0,2% de arabinose. Linhas 5, 6, 11 e 12: Extratos de células induzidas com 0,3% de arabinose. As proteínas foram coradas com Coomassie Blue.



Figura 21: Perfil eletroforético da proteína GlnR purificada



Eletroforese em SDS-PAGE 12% das frações purificadas de GlnR. Linha 1: marcador de massa molecular (Page Ruler Unstained Protein Ladder - Fermentas). Linha 2: fração eluída na injeção da coluna HiTrap-Q (5mL). Linha 3: fração purificada por afinidade em HiTrap-Heparine (5mL) após diálise.

A proteína GlnR-His foi expressa em *E. coli* estirpe BL21AI, a 30°C durante 3 horas após a adição de arabinose a 0,2%. A proteína de fusão GlnR-His possui uma seqüência contendo 6 resíduos de histidina o que permite sua purificação através de cromatografia de afinidade utilizando a coluna Hi-Trap Chelating (Amersham) previamente carregada com NiCl<sub>2</sub>. Esta purificação é possível devido à formação de complexos entre os resíduos de histidinas e o níquel ligado à resina na coluna.

A proteína GlnR-His foi eluída da coluna com cerca de 450mM de imidazol. As frações com maior grau de pureza foram reunidas e dialisadas para remoção do imidazol. Após a purificação por cromatografia de afinidade, a análise densitométrica em SDS-PAGE corado com Coomassie Blue mostrou que esta proteína apresentava 97% de pureza (Figura 22). O rendimento a partir de 21,3mg de proteínas presentes na fração solúvel foi de 1,38mg ou 6,5%.

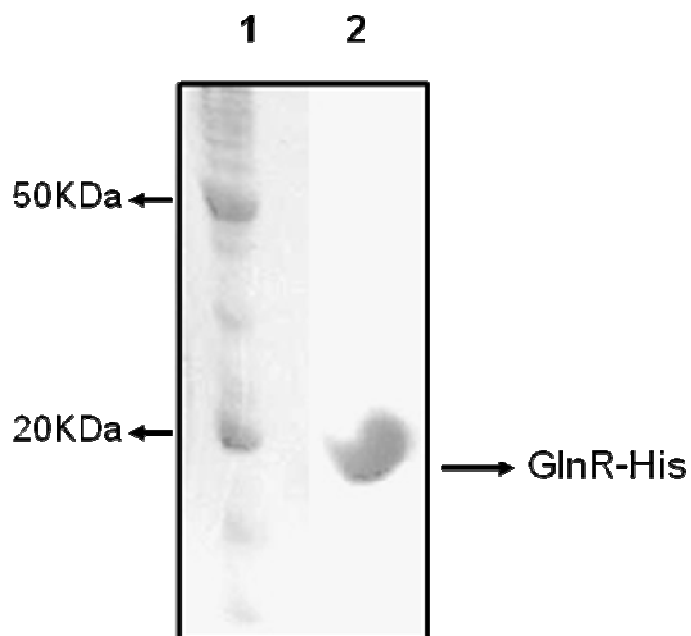
Após a purificação, as proteínas GlnR e GlnR-His formavam agregados insolúveis em concentrações próximas a 1mM. A indução a 16°C por 16 horas aumentou a estabilidade destas proteínas e este procedimento foi adotado para as purificações seguintes. As purificações após a indução a 16°C tiveram rendimento em torno de 15%.

#### 4.6 Análise da ligação da proteína GlnR às regiões promotoras de genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio.

##### 4.6.1 Estudo dos promotores dos operons *amtBglN*K e *glnRA* de *S. mutans*

A análise das regiões à montante dos operons *amtBglN*K e *glnRA* permitiu a identificação de seqüências potencialmente reconhecidas por GlnR. Além disso, foram identificadas nestas regiões seqüências descritas como reconhecidas pela subunidade  $\sigma^A$  da RNA polimerase, de *B. subtilis* (Figura 23). A região promotora do operon *glnRA* de *S. mutans* apresenta regiões -35 e -10 canônicas  $\sigma^{70}$  de *E. coli*. O promotor de *glnKamtB* de *S. mutans* é do tipo “extended -10”. O elemento “extended -10” está localizado diretamente à montante do elemento -10 e compreende quatro nucleotídeos com a seqüência consenso TRTG (VOSKUIL & CHAMBLISS, 2002).

Figura 22: Proteína GlnR-His purificada por cromatografia de afinidade



Eletroforese em SDS-PAGE 12% de GlnR-His purificada. Linha 1: marcador de massa molecular (Page Ruler Unstained Protein Ladder - Fermentas). Linha 2: fração purificada pela coluna HiTrap Chelating HP após diálise.

Figura 23: Sequências das regiões promotoras dos operons *amtBglnK* e *glnRA* de *S. mutans*

Promotor de *amtBglnK* de *S. mutans*

```
-144 AAGCTTTAGA GCCCTAGTAC TATAATATTT TCAAATAATA TAAGATGTTA TATTCTCTGA
-84 ATTTTITAGAA AATTTTCGCCA AAAAATCTTT TATTTTCCTG AAAATATGTT ATATTATATA
-24 ACATAAAGGG AGGTGCTGAT AGATATGGAT TCAGGATCTA TAGCATTAT TATC
      *
```

Promotor de *glnRA* de *S. mutans*

```
-311 CAATATTTAC CACGTTAACC ATTATGACTA ATGTGGCCAT GAGTAATAAG ACGGGAATTA
-251 TTGGTGGTGT TGCAGCTTTG CTTATTATTA CGCTTTCTAT TCCCAAAGAT GAAACAATTC
-191 TTTATGTTTG TGCTAGAGTT TTTGAACTT TTGTAGGGGT TTTTATTGCC ATTTCTGTTA
-131 ATTCAGATAT TGATAGAGTA CGAAAATTTT TTACAAAAG TAAAGTTTAG AGTTTATGTC
-71 AGGAAATATG ACATATAGGC TTGACAGCTA TAAATTTTCA GAATATAATA GACAATGAAA
-11 GGAGGAAAGT C
      *
```

As prováveis regiões reconhecidas por  $\sigma^A$  -35 e (“*extended*”) -10 estão destacadas em amarelo. Os prováveis sítios de ligação para GlnR estão representados em retângulos. O códon de início de tradução do gene *amtB* está representado em vermelho. Os números indicam a posição em relação ao códon de início de tradução. As supostas bases de início de transcrição estão identificadas por um asterisco. As seqüências representadas correspondem aos fragmentos utilizados nos experimentos de retardamento de banda de DNA em gel.

Um provável sítio de ligação para proteína GlnR ao DNA foi localizado na região promotora dos operons *glnKamtB* e *glnRA* de *S. mutans* (Figura 23). A capacidade de ligação da proteína GlnR à região promotora destes operons foi avaliada pela técnica de retardamento de migração da banda de DNA em gel de poliacrilamida.

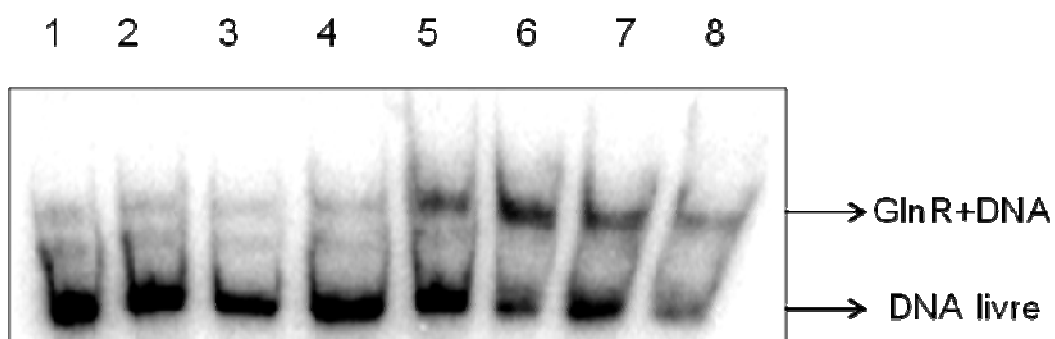
#### 4.6.2 Análise da ligação da proteína GlnR às regiões promotoras dos operons *glnRA* e *amtBglnK* de *S. mutans*.

A proteína GlnR purificada foi capaz de retardar a migração dos fragmentos contendo as duas regiões promotoras (Figuras 24 e 25) a partir da 50 nM de proteína. Nesta concentração de GlnR, 3,2 % dos fragmentos de DNA contendo a região promotora de *glnRA* utilizados no experimento tiveram seu padrão de migração alterado (Figura 20). Este resultado confirma a capacidade de ligação de GlnR ao DNA, como bem documentado em outros organismos (AMON, 2010). A proteína GlnR na concentração de 400nM foi capaz de retardar a migração de apenas 23,1% dos fragmentos de DNA contendo a região promotora de *glnRA*.

A constante de dissociação ( $K_d$ ) aproximada foi calculada como a concentração de proteína capaz de ligar-se a 50% dos fragmentos de DNA. Este cálculo resultou em uma  $K_d$  aproximada de 845,0nM para a ligação GlnR-DNA. Entretanto não foi observada a formação de complexo com 100% dos fragmentos de DNA na concentração máxima de GlnR (400nM) e não foi possível aumentar a concentração desta proteína nestes experimentos devido a agregação. Estas condições tornam pouco confiável o cálculo da  $K_d$ .

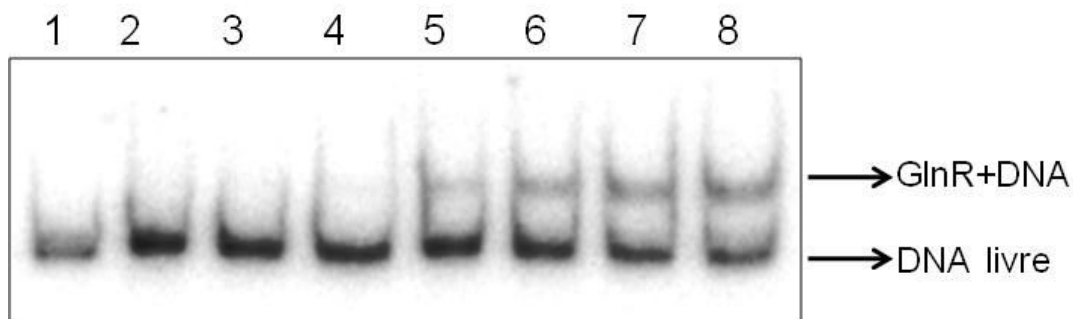
Em seguida, foi verificada a estabilidade da ligação de GlnR ao DNA. Para isso foram realizados experimentos de retardamento de migração da banda de DNA em gel na presença de DNA marcado e não marcado radioativamente.

Figura 24: Efeito da concentração de GlnR sobre a ligação ao promotor do operon *amtBglnK*



Autoradiograma de eletroforese em gel nativo de poliacrilamida a 6,5%. Experimento realizado com 1,44nM de DNA do promotor de *amtBglnK* e concentrações crescentes de GlnR. Linha 1: ausência de GlnR; Linha 2: 5nM de GlnR; Linha 3: 10nM de GlnR; Linha 4: 25nM de GlnR; Linha 5: 50nM de GlnR; Linha 6: 100nM de GlnR; Linha 7: 250 nM de GlnR; Linha 8: 400nM de GlnR.

Figura 25: Efeito da concentração de GlnR sobre a ligação ao promotor do operon *glnRA*



Autoradiograma de eletroforese em gel nativo de poliacrilamida a 6,5%. Experimento realizado com 1,44nM de DNA do promotor de *glnRA* e concentrações crescentes de GlnR. Linha 1: ausência de GlnR; Linha 2: 5nM de GlnR; Linha 3: 10nM de GlnR; Linha 4: 25nM de GlnR; Linha 5: 50nM de GlnR; Linha 6: 100nM de GlnR; Linha 7: 250 nM de GlnR; Linha 8: 400nM de GlnR.

A concentração de GlnR foi fixada em 400nM e a concentração de DNA contendo o promotor do operon *glnRA* marcado radioativamente foi fixada em 1,44 nM. Após incubar com DNA marcado foi adicionado DNA não marcado homólogo e heterólogo em concentrações de 1,44; 14,4 e 144 nM (Figura 26). O DNA marcado foi deslocado apenas na concentração de 144 nM de DNA, que corresponde a 100 vezes a concentração inicial de DNA. O que confirma a alta especificidade da ligação de GlnR ao DNA das regiões promotoras testadas.

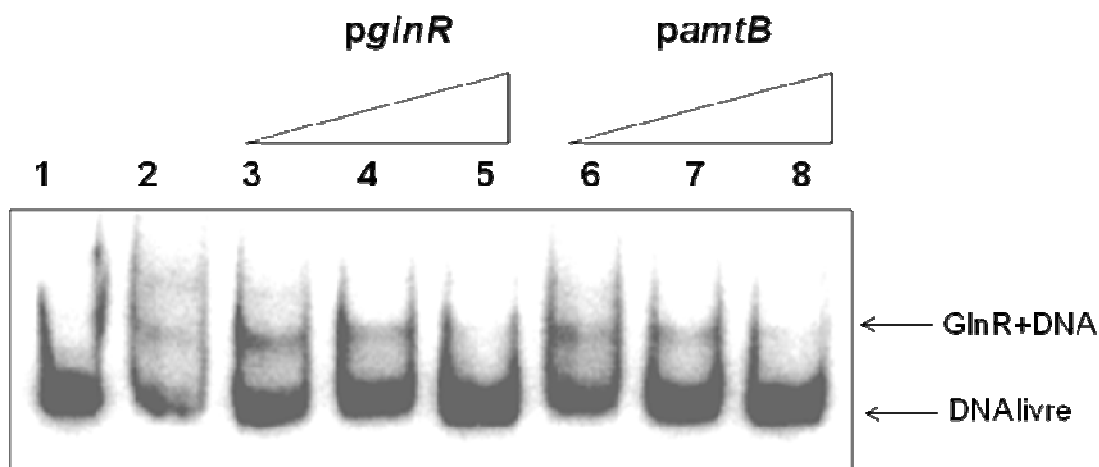
#### 4.7 Efeito de GlnK na afinidade de ligação de GlnR ao DNA

A afinidade de GlnR ao DNA foi avaliada em presença de GlnK através experimentos de retardamento de banda de DNA em gel (Figura 27). Na ausência de GlnK, GlnR foi capaz de ligar-se ao DNA em concentrações a partir de 50nM. Quando GlnK estava presente em concentrações 10 vezes maiores em relação a GlnR, esta foi capaz de ligar-se ao DNA a partir da concentração de 25nM. Comprovando a hipótese de que GlnK é capaz de aumentar a afinidade de GlnR por DNA.

Em seguida, para verificar se o aumento na afinidade de GlnR pelo DNA é dependente da concentração de GlnK presente na reação, foram realizados experimentos de retardamento de banda de DNA em gel com concentração de GlnR fixa em 250nM e concentrações crescentes de GlnK (Figura 28). Aparentemente GlnK exerce dois efeitos sobre GlnR. Em concentrações equimolares, ela estabiliza a ligação entre GlnR e DNA, porém sem formar um complexo ternário estável (Figura 28, linha 5). E em concentrações maiores, a partir de um excesso de quatro vezes de GlnK em relação a GlnR, GlnK forma um complexo ternário estável com GlnR e DNA (Figura 28, linha 7)

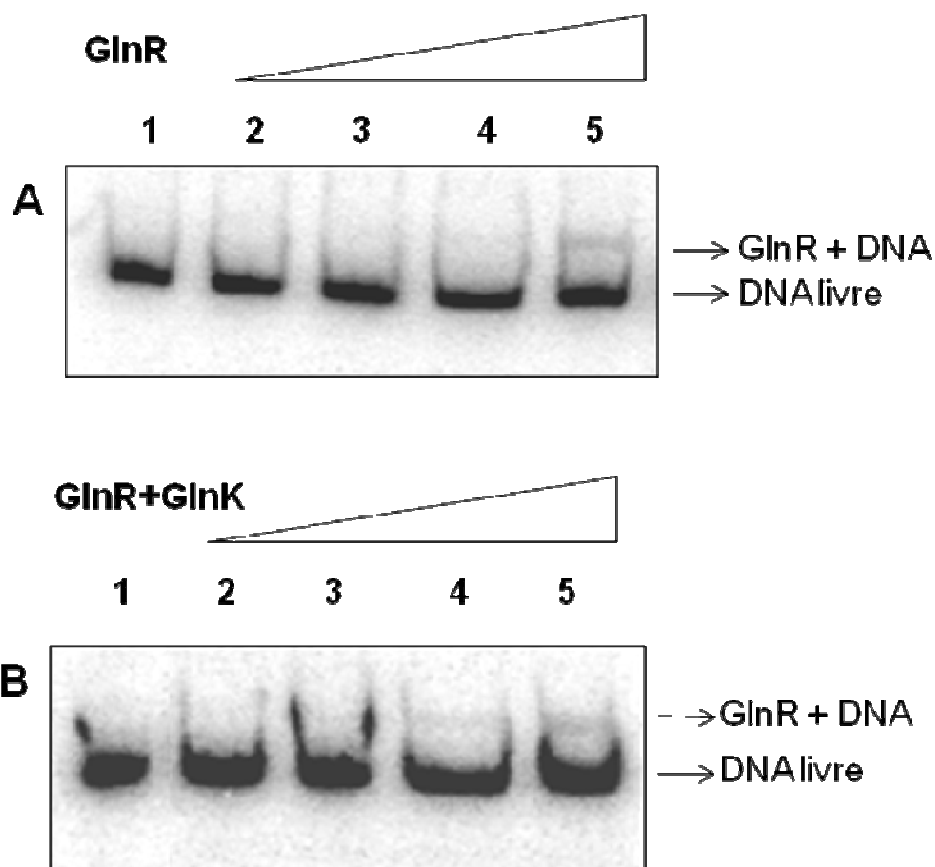


Figura 26: Efeito da concentração de DNA competidor sobre a ligação de GlnR ao promotor do operon *glnRA*



Autoradiograma de eletroforese em gel nativo de poliacrilamida a 6,5%. Experimento realizado com 1,44nM do fragmento de DNA do promotor de *glnRA* marcado radioativamente em todas as reações. GlnR foi adicionada em concentração fixa de 400nM nas reações presentes nas linhas 2 a 8. Concentrações crescentes de DNA homólogo (contendo o *pglnRA*) não marcado foram adicionadas às reações presentes nas linhas 3 a 5 e concentrações crescentes de DNA heterólogo (contendo o *pamtBglnK*) não marcado foram adicionadas às reações nas linhas 6 a 8. Linha 1: controle negativo na ausência de GlnR; Linha 2: controle positivo na presença de GlnR; Linha 3: adição de 1,44nM de DNA homólogo não marcado; Linha 4: adição de 14,4nM de DNA homólogo não marcado; Linha 5: adição de 144nM de DNA homólogo não marcado; Linha 6: adição de 1,44nM de DNA heterólogo não marcado; Linha 7: adição de 14,4nM de DNA heterólogo não marcado; Linha 8: adição de 144nM de DNA heterólogo não marcado.

Figura 27: Efeito de GlnK na ligação de GlnR ao promotor do operon *glnRA*



Autoradiograma de eletroforese em gel nativo de poliacrilamida a 6,5%. Experimento realizado com 1,44nM de DNA contendo o promotor do operon *glnRA* em todas as reações. (A) Linha 1: ausência de GlnR; Linha 2: presença de 5nM de GlnR; Linha 3: presença de 10nM de GlnR; Linha 4: presença de 25nM de GlnR; Linha 5: presença de 50nM de GlnR; (B) Linha 1: ausência de GlnR e GlnK; Linha 2: presença de 5nM de GlnR e 50nM de GlnK; Linha 3: presença de 10nM de GlnR e 100nM de GlnK; Linha 4: presença de 25nM de GlnR e 250nM de GlnK; Linha 5: presença de 50nM de GlnR e 500nM de GlnK.

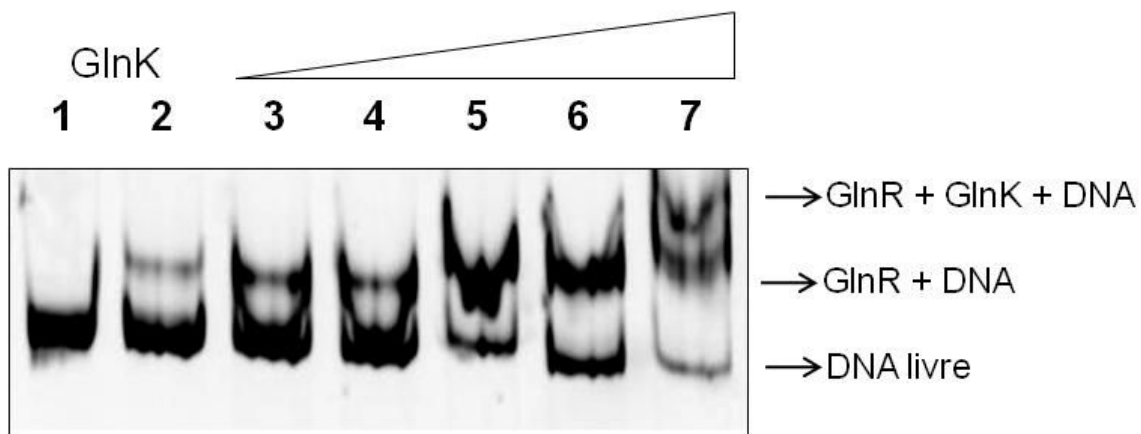
#### 4.8 Análise da interação entre as proteínas GlnR e GlnK

A interação de proteínas do tipo PII com reguladores de transcrição é conhecida em microrganismos gram-positivos. Em *Corynebacterium glutamicum* AmtR, um membro da família TetR de reguladores transcricionais, responsável pela repressão do operon *amtBglnKglnD*, do gene *glnA* além de outros 25 genes, é capaz de interagir com a proteína GlnK adenililada. Esta interação desfaz o complexo AmtR-DNA (BECKERS et al., 2005). Em *B. subtilis* a proteína GlnK associada à membrana via AmtB interage com TnrA. Os efetores 2-oxoglutarato e ATP desfazem o complexo ternário (HEINRICH et al., 2006).

Até o momento não foi descrita a interação entre as proteínas GlnR e GlnK de *S. mutans*. Para verificar a existência de interação entre estas proteínas, foram realizados experimentos de co-precipitação *in vitro*, utilizando as proteínas GlnR nativa e GlnK-His purificadas na presença (Figura 29 A) ou ausência de DNA (Figura 29 B) e efetores de GlnK.

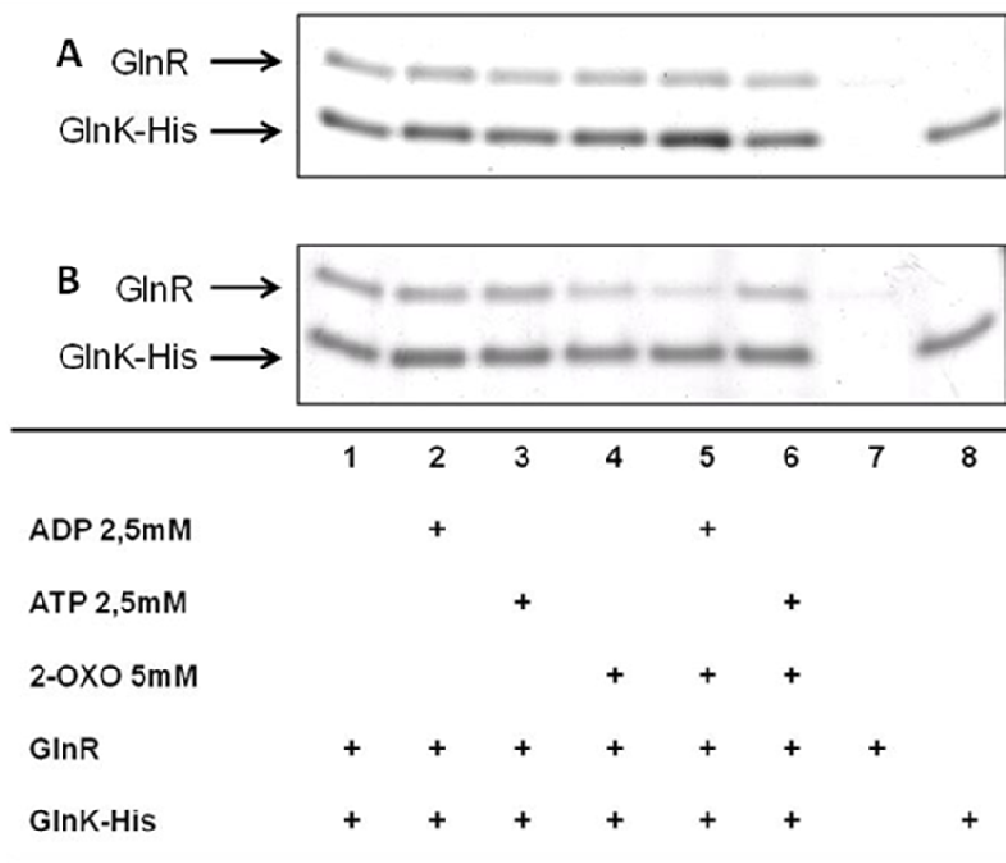
GlnK não é capaz de ligar-se ao DNA. GlnR interagiu com GlnK tanto na presença quanto na ausência de DNA e efetores. Esta ligação não foi influenciada pelos efetores na presença de DNA contendo o promotor do operon *glnRA*. Entretanto, em sua ausência a afinidade de GlnK-His por GlnR foi diminuída na presença de 2-oxoglutarato. Nesta condição houve redução de 5 vezes na quantidade de GlnR co-eluída juntamente com GlnK-His (Figura 29 B, linha 4).

Figura 28: Efeito da concentração de GlnK sobre a ligação de GlnR ao promotor do operon *glnRA*



Gel nativo de poliacrilamida a 6,5%. GlnR (250nM) foi incubada na presença de 10nM de um fragmento de DNA contendo o promotor de *glnRA* e concentrações crescentes de GlnK. Linha 1: ausência de GlnR e GlnK; Linha 2: GlnR; Linha 3: GlnR e 50nM de GlnK; Linha 4: GlnR e 100nM de GlnK; Linha 5: GlnR e 250nM de GlnK; Linha 6: GlnR e 500nM de GlnK; Linha 7: GlnR e 1μM de GlnK. Gel corado com SybrGreen (Invitrogen).

Figura 29: Interação de GlnK e GlnR de *S. mutans* *in vitro*



A e B: Gel de Tricina-SDS PAGE 10% contendo a fração eluída de experimentos de co-precipitação de GlnR e GlnK-His na presença de efetores. Neste experimento foram utilizados 15µg GlnK-His e 7,5µg GlnR na presença de 25nM DNA (A) ou ausência de DNA (B). Linha 1: presença de GlnR e GlnK-His; Linha 2: presença de GlnR, GlnK-His e 2,5mM de ADP; Linha 3: presença de GlnR, GlnK-His e 2,5mM de ATP; Linha 4: presença de GlnR, GlnK-His e 5,0mM de 2-oxoglutarato; Linha 5: presença de GlnR, GlnK-His, 2,5mM de ADP e 5,0mM de 2-oxoglutarato; Linha 6: presença de GlnR, GlnK-His, 2,5mM de ATP e 5,0mM de 2-oxoglutarato; Linha 7: presença de GlnR; Linha 8: presença de GlnK-His. As flechas indicam as proteínas eluídas na presença de 1M de imidazol. Gel corado com Coomassie coloidal. Resultado representativo de dois experimentos independentes.

#### 4.10 Efeito de 2-oxoglutarato, ADP e ATP sobre a ligação do complexo GlnR-GlnK ao DNA

Experimentos de retardamento de banda de DNA em gel foram realizados na presença das proteínas GlnR e GlnK-His e das moléculas efetoras de GlnK, 2-oxoglutarato, ADP e ATP (Figura 28).

Aparentemente, o complexo ternário GlnR-GlnK-DNA é estável nas condições utilizadas neste experimento, uma vez que a mobilidade da banda de DNA na presença deste é menor do que a mobilidade da banda na presença de GlnR apenas (Figura 30, linhas 2 e 3).

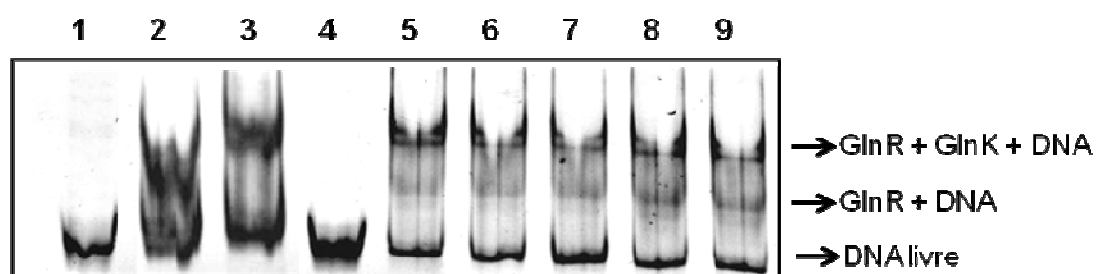
Os resultados obtidos mostram que a ligação de GlnR ao DNA não é afetada pelos efetores. Na presença de efetores, o complexo GlnK-GlnR continua ligado ao DNA (Figura 30). Para verificar se a ausência de efeito das moléculas sinalizadoras era devida à concentração utilizada no experimento, foram feitas curvas de concentração para cada um dos efetores (Figuras 31, 32 e 33). Nestas curvas não houve diferença no padrão de migração do DNA em concentrações de 0,5 a 10,0mM de 2-oxoglutarato, 0,1 a 5,0mM de ADP e 0,1 a 5,0mM de ATP.

Os resultados obtidos nestes experimentos de retardamento de banda de DNA em gel mostram que, em presença de DNA, 2-oxoglutarato, ADP e ATP não modulam a interação entre GlnR, GlnK-His e DNA. Este resultado confirma o obtido no ensaio de co-precipitação na presença de DNA (Figura 29 A), onde não houve variação na eluição conjunta de GlnK-His e GlnR, independentemente da presença de efetores.

Tendo em vista o efeito da presença de DNA observado nos experimentos de co-precipitação, os experimentos de retardamento de banda de DNA em gel foram repetidos adicionando o DNA após a formação do complexo GlnR-GlnK na presença dos efetores. Dessa forma seria possível observar um possível efeito das moléculas sinalizadoras sobre o complexo antes de sua ligação ao DNA (Figura 34). Na presença de 2-oxoglutarato, a banda de DNA livre foi mais intensa quando comparada à observada na ausência de 2-OG (Figura 34, linhas 7, 8 e 9). Este resultado confirma que 2-oxoglutarato inibe a formação do complexo antes de sua ligação ao DNA, efeito observado no ensaio de co-precipitação (Figura 29 B).

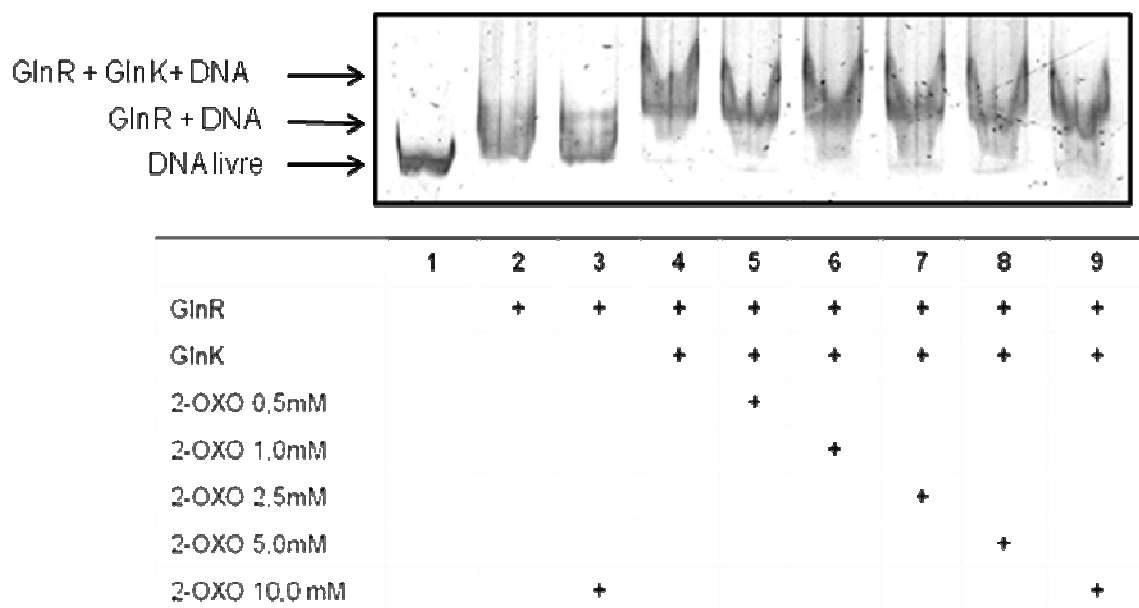
Estes resultados sugerem que, em condições de baixa disponibilidade de nitrogênio, ou altos níveis de 2-oxoglutarato, GlnK não aumenta a afinidade de GlnR aos promotores-alvo.

Figura 30: Efeito de 2-oxoglutarato, ADP e ATP sobre a afinidade do complexo GlnR-GlnK ao DNA



GlnR (250nM) foi incubada na presença de 10nM de DNA contendo o promotor do operon *glnRA*, 1μM de GlnK e efetores. Linha 1: ausência de GlnR; Linha 2: presença de GlnR; Linha 3: presença de GlnR e GlnK; Linha 4: presença de GlnK; Linha 5: presença de GlnR, GlnK e 0,5mM de ADP; Linha 6: presença de GlnR, GlnK e 0,5mM de ATP; Linha 7: presença de GlnR, GlnK e 1mM de 2-oxoglutarato; Linha 8: presença de GlnR, GlnK, 0,5mM de ADP e 1mM de 2-oxoglutarato; Linha 9: presença de GlnR, GlnK, 0,5mM de ATP e 1mM de 2-oxoglutarato. Gel corado com Sybr Green (Invitrogen). Resultado representativo de três experimentos independentes.

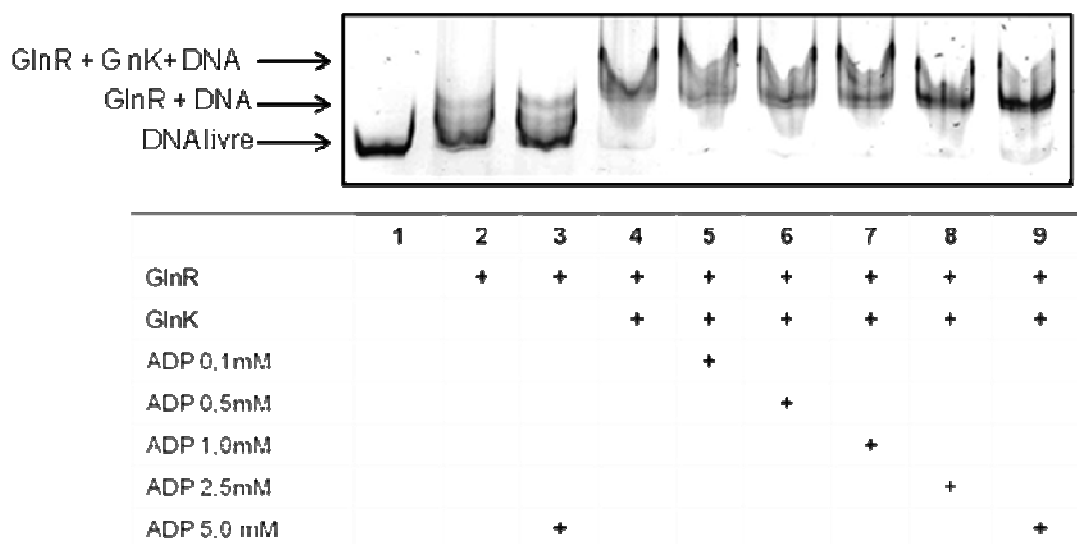
Figura 31: Efeito da concentração de 2-oxoglutarato sobre a ligação do complexo GlnR-GlnK ao DNA.



GlnR (250nM) foi incubada na presença de 10nM de DNA contendo o promotor do operon *glnRA*, 250nM de GlnK e 2-oxoglutarato. Linha 1: ausência de GlnR; Linha 2: presença de GlnR; Linha 3: presença de GlnR e 10mM de 2-oxoglutarato; Linha 4: presença de GlnR e GlnK; Linha 5: presença de GlnR, GlnK e 0,5mM de 2-oxoglutarato; Linha 6: presença de GlnR, GlnK e 1,0mM de 2-oxoglutarato; Linha 7: presença de GlnR, GlnK e 2,5mM de 2-oxoglutarato; Linha 8: presença de GlnR, GlnK, 5,0mM de 2-oxoglutarato; Linha 9: presença de GlnR, GlnK e 10,0mM de 2-oxoglutarato. Gel corado com Sybr Green (Invitrogen).

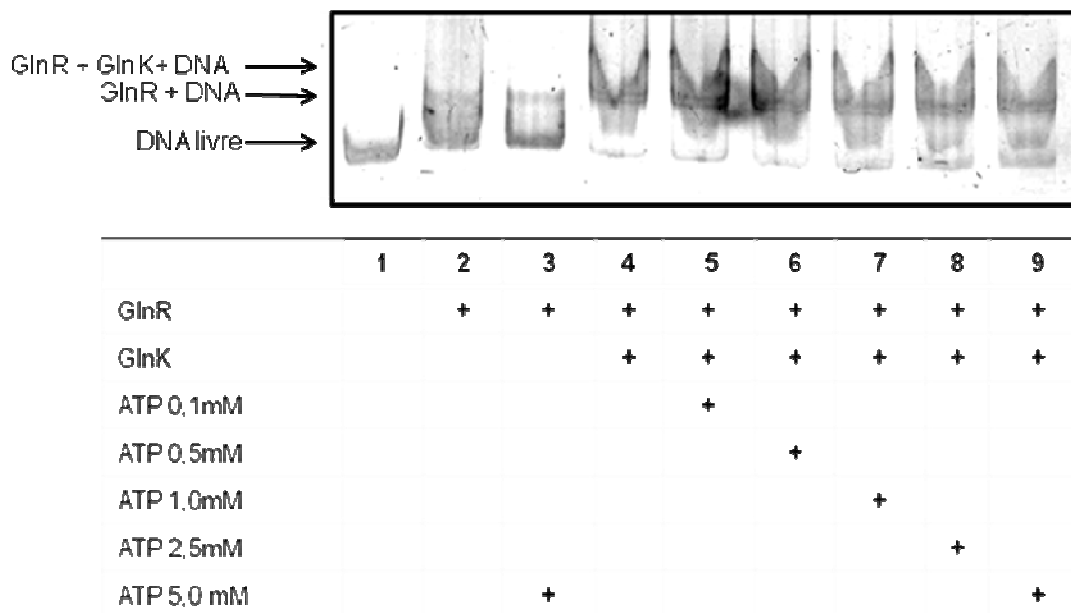


Figura 32: Efeito da concentração de ADP sobre a ligação do complexo GlnR-GlnK ao DNA.



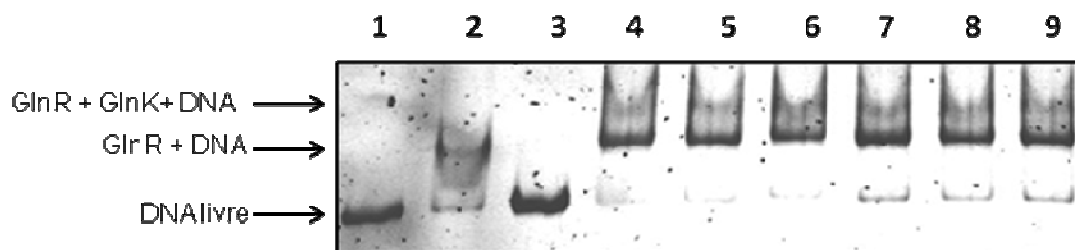
GlnR (250nM) foi incubada na presença de 10nM de DNA contendo o promotor do operon *glnRA*, 250nM de GlnK e ADP. Linha 1: ausência de GlnR; Linha 2: presença de GlnR; Linha 3: presença de GlnR e 5,0mM de ADP; Linha 4: presença de GlnR e GlnK; Linha 5: presença de GlnR, GlnK e 0,1mM de ADP; Linha 6: presença de GlnR, GlnK e 0,5mM de ADP; Linha 7: presença de GlnR, GlnK e 1,0mM de ADP; Linha 8: presença de GlnR, GlnK, 2,5mM de ADP; Linha 9: presença de GlnR, GlnK e 5,0mM de ADP. Gel corado com Sybr Green (Invitrogen).

Figura 33: Efeito da concentração de ATP sobre a ligação do complexo GlnR-GlnK ao DNA.



GlnR (250nM) foi incubada na presença de 10nM de DNA contendo o promotor do operon *glnRA*, 250nM de GlnK e ATP. Linha 1: ausência de GlnR; Linha 2: presença de GlnR; Linha 3: presença de GlnR e 5,0mM de ATP; Linha 4: presença de GlnR e GlnK; Linha 5: presença de GlnR, GlnK e 0,1mM de ATP; Linha 6: presença de GlnR, GlnK e 0,5mM de ATP; Linha 7: presença de GlnR, GlnK e 1,0mM de ATP; Linha 8: presença de GlnR, GlnK, 2,5mM de ATP; Linha 9: presença de GlnR, GlnK e 5,0mM de ATP. Gel corado com Sybr Green (Invitrogen).

Figura 34: Efeito de 2-oxoglutarato, ADP e ATP sobre a afinidade do complexo GlnR-GlnK ao DNA



GlnR (100nM) foi incubada na presença 200nM de GlnK e efetores e em seguida 10nM de DNA contendo o promotor do operon *glnR* foram adicionados ao sistema. Linha 1: ausência de GlnR; Linha 2: presença de GlnR; Linha 3: presença de GlnK; Linha 4: presença de GlnR e GlnK; Linha 5: presença de GlnR, GlnK e 2,5mM de ADP; Linha 6: presença de GlnR, GlnK e 2,5mM de ATP; Linha 7: presença de GlnR, GlnK e 5,0mM de 2-oxoglutarato; Linha 8: presença de GlnR, GlnK, 2,5mM de ADP e 5,0mM de 2-oxoglutarato; Linha 9: presença de GlnR, GlnK, 2,5mM de ATP e 5,0mM de 2-oxoglutarato. Gel corado com Sybr Green (Invitrogen).

## 5. DISCUSSÃO

GlnR é um regulador específico do metabolismo de nitrogênio em membros do filo *Firmicutes*, da classe *Bacilli*, como *Saphylococcaceae*, *Listeriae* e *Lactobacillales* e do filo *Actinobacteria* como os gêneros *Mycobacterium* e *Streptomyces* (SCHREIER et al., 2000, VARMANEN et al., 2000, DOROSHCHUK et al., 2006, KLOOSTERMAN et al., 2006, LARSEN et al., 2006, HENDRIKSEN et al., 2008).

Em *S. mutans*, a função de GlnR foi estudada na resposta de tolerância a ácidos. Uma estirpe mutante *glnR*<sup>-</sup>, teve seu padrão de expressão analisado confirmando o papel de GlnR na repressão da transcrição de diversos genes. Mesmo em pH neutro, a expressão de *glnA* e outros genes foi significativamente aumentada no mutante *glnR*<sup>-</sup> o que levou os autores a sugerir que a atividade de GlnR é modulada pela disponibilidade de nutrientes nestas condições (CHEN et al., 2010).

No presente trabalho foi estabelecido um protocolo de purificação da proteína GlnR de *S. mutans* em sua forma nativa e fusionada a seis resíduos de histidina (Figuras 16 a 23). A proteína GlnR de *S. mutans* purificada foi então avaliada *in vitro* quanto à sua atividade de ligação à região promotora de operons possivelmente envolvidos na assimilação de nitrogênio.

### 5.1 Promotores reconhecidos por GlnR

Em *B. subtilis*, GlnR age como repressora de transcrição dos operons *glnRA*, *ureABC* e do gene *tnrA* (BROWN & SONENSHEIN, 1996, WRAY et al., 1997, ZALIECKAS et al., 2006). O operon *glnRA* é responsável pela síntese da própria GlnR e pela glutamina sintetase, o operon *ureABC* codifica as subunidades da urease e o gene *tnrA* codifica para a proteína TnrA, uma reguladora transcricional (WRAY et al., 1996, 1997, 1998).

Em *S. pneumoniae*, GlnR reprime a transcrição de genes envolvidos na síntese e transporte de glutamina (*glnA* e *glnPQ*), síntese de glutamato (*gdhA*) (KLOOSTERMAN et al., 2006). Além dos operons *glnPQ* e *glnRA*, GlnR é responsável pela repressão da transcrição do operon *amtBglnK* em condições de excesso de nitrogênio em *Lactococcus lactis* (LARSEN et al., 2006).

Nestes microrganismos, a região promotora dos genes regulados por GlnR apresentam a sequência palindrômica bem conservada 5'-TGTNAN<sub>7</sub>TNACA-3', conhecida como "GlnR-box". Na maioria dos promotores conhecidos como regulados por GlnR, a sequência "GlnR-box" encontra-se à montante ou sobreposta ao sítio de ligação para a subunidade  $\sigma^A$  da RNA polimerase (Figura 5). Entretanto, em alguns promotores, como

*PglnPQ*, em *L. lactis*, a “GlnR-box” encontra-se 28pbs após o códon de início de tradução. Esta disposição dos sítios de ligação sugere dois modos de atividade de GlnR como repressora: (1) repressão por impedimento estérico, pela ligação próxima ao sítio de ligação da RNA polimerase e (2) repressão pelo bloqueio da fase de alongação da transcrição, pela ligação ao início da região codificadora (LLOYD et al., 2001, RADIONOV, 2007).

Em *S. mutans*, a “GlnR-box” apresenta duas bases a mais em relação à descrita para os microrganismos acima (5'-ATGTNAN<sub>7</sub>TNACAT-3') (BRANDENBURG et al., 2002, CHEN et al., 2010). Neste microrganismo, o promotor do operon *glnRA* contém a sequência “GlnR-box” à montante do sítio de ligação para RNA polimerase e o promotor de *amtBglnK* apresenta a “GlnR-box” sobreposta a esta sequência (Figura 14). Provavelmente, a ligação de GlnR a estes promotores impede a ligação da subunidade  $\sigma$  da RNA polimerase, levando à repressão da transcrição.

As regiões promotoras dos operons *glnRA* e *amtBglnK* de *S. mutans* foram amplificadas por PCR e os fragmentos resultantes foram utilizados juntamente com a proteína GlnR purificada em experimentos de retardamento de banda de DNA em gel (Figuras 24 e 25). Os resultados obtidos confirmam que a proteína GlnR de *S. mutans* é capaz de interagir *in vitro* com fragmentos de DNA contendo estas regiões promotoras. Experimentos de competição utilizando fragmentos de DNA marcado radioativamente e fragmentos não marcados mostraram que a interação de GlnR ao DNA contendo regiões promotoras destes operons é específica (Figura 26). Os resultados destes experimentos mostram que a interação GlnR-DNA é estável e apenas na condição de excesso de 100 vezes de DNA não marcado em relação ao DNA marcado houve deslocamento dos fragmentos ligados à GlnR (Figura 26, linhas 5 e 8).

## 5.2 Interação GlnR-GlnK

Uma vez caracterizada a capacidade da proteína GlnR de *S. mutans* de ligar-se às regiões promotoras de operons envolvidos no metabolismo de nitrogênio, prováveis moduladores desta ligação foram estudados. A presença de moléculas sinalizadoras dos níveis de nitrogênio não altera o padrão de ligação de GlnR ao DNA (Figuras 31, 32 e 33, todos na linha 3), o que sugere que esta proteína não responde diretamente às condições de nitrogênio, necessitando de outra forma de sinalização.

A regulação da atividade de fatores de transcrição por proteínas do tipo PII foi descrita em diferentes microrganismos (SANT'ANNA et al., 2009). Na maioria dos casos descritos esta regulação resulta de interação direta de PII com o fator de transcrição de acordo com os níveis de nitrogênio disponíveis na célula (BECKERS et al., 2005,

HEINRICH et al., 2006). Em outros casos a regulação é indireta (ESPINOSA et al., 2007, GLÖER et al., 2008).

Em *Corynebacterium glutamicum* AmtR, um membro da família TetR de reguladores transcricionais, responsável pela repressão do operon *amtBglnKglnD*, do gene *glnA* além de outros 25 genes, é capaz de interagir com a proteína GlnK adenilada. Esta interação promove a dissociação do complexo AmtR-DNA (BECKERS et al., 2005).

Em *B. subtilis* a proteína GlnK associada à membrana via AmtB interage com TnrA. Os efetores 2-oxoglutarato e ATP dissociam o complexo ternário (HEINRICH et al., 2006).

Em *Synechococcus elongatus*, uma proteína do tipo PII regula a atividade de NtcA, o regulador global do metabolismo de nitrogênio. Neste microrganismo a proteína PipX é co-ativadora de NtcA. Em baixos níveis de 2-oxoglutarato, PII liga-se a PipX. Em altos níveis de 2-oxoglutarato, PipX é liberada para ligar-se a NtcA, aumentando a expressão de genes envolvidos com a assimilação de nitrogênio (ESPINOSA et al., 2007, FOKINA et al., 2010).

Em *Klebsiella pneumoniae*, a proteína GlnK interage com NifA, um ativador transcricional *nif*-específico, o qual é inibido por interação com NifL. NifA e NifL regulam a transcrição de genes envolvidos na fixação de nitrogênio em resposta ao amônio. Neste sistema GlnK liga-se a ambas as proteínas na ausência de 2-oxoglutarato, ao passo que, na presença de 2-oxoglutarato, NifA é liberada mas NifL permanece ligada a GlnK (GLÖER et al., 2008).

Tendo em vista que nos microrganismos mencionados a atividade de fatores de transcrição é regulada pela proteína GlnK, foram realizados experimentos de co-precipitação utilizando as proteínas GlnR e GlnK de *S. mutans*. Os resultados destes experimentos revelaram que GlnR interage com GlnK *in vitro* e que esta interação é inibida por 2-oxoglutarato na ausência de DNA (Figura 29 B).

### 5.3 Efeito de ADP, ATP e 2-oxoglutarato

A transdução de sinal das proteínas do tipo PII em diversos microrganismos é mediada por ATP, ADP e 2-oxoglutarato (NINFA & JIANG, 2005; HUERGO et al., 2007). E como, aparentemente a proteína GlnK não é modificada pós-traducionalmente em *S. mutans*, este pode ser o único mecanismo de regulação de sua atividade neste microrganismo (PORTUGAL et al., 2006).

O sítio de ligação para 2-oxoglutarato foi identificado na proteína GlnZ de *Azospirillum brasilense*, paróloga de GlnK (TRUAN et al., 2010). A comparação de seqüências entre esta proteína e a proteína GlnK de *S. mutans* mostra que este sítio é

altamente conservado (Figura 35). De oito resíduos diretamente envolvidos com a ligação estável de 2-oxoglutarato a GlnZ (Gly37, Gln39, Gly41, Thr43, Leu56, Lys58, Ile86, Gly87), sete são conservados na GlnK de *S. mutans*, e o resíduo de Ile86 está substituído por um resíduo de Val, e ambos resíduos são hidrofóbicos. O sítio de ligação para 2-oxoglutarato encontrada para a proteína GlnK de *S. elongatus* também tem alta similaridade com descrita para GlnZ de *A. brasilense* (FOKINA et al., 2010).

Os sítios de ligação para efetores na proteína GlnZ de *A. brasilense* podem estar ocupados por ADP, ATP na presença de magnésio (MgATP) ou MgATP mais 2-oxoglutarato. Baseados em informações estruturais os autores sugerem que a ligação de GlnZ aos efetores são caracterizadas pelas interações da Lys58 com Gln39, Glu44 ou com o grupo 5-carboxi do 2-oxoglutarato respectivamente. Cada um dos modos de ligação resultaria em um ajuste conformacional importante para a interação de GlnZ com seus alvos celulares (TRUAN et al., 2010). Os resíduos Lys58, Gln39 e Glu44 encontram-se conservados na sequência de GlnK de *S. mutans* (Figura 35). Em *S. elongatus*, os resíduos Arg38, Gly87, Gly89, Lys90, Arg101 e Arg103 foram identificados como parte do sítio de ligação para MgATP (FOKINA et al., 2010). Todos estes resíduos estão conservados na sequência de GlnK de *S. mutans* (Figura 35).

Dois estudos em *E. coli*, mostraram uma queda rápida de cinco vezes nos níveis celulares de 2-OG após choque de amônio e mudanças transitórias nas taxas de ATP/ADP também foram observadas (RADCHENKO et al., 2010, YUAN et al., 2009). A inibição da interação GlnR-GlnK por 2-oxoglutarato (Figura 29B) pode indicar que em situações de crescimento em baixos níveis de nitrogênio, não ocorre a interação GlnR-GlnK. Após um choque de amônio, a queda nos níveis intracelulares de 2-oxoglutarato possivelmente favorece a interação GlnR-GlnK.

#### 5.4 Efeito de GlnK sobre a ligação GlnR-DNA

Em seguida, neste trabalho, o efeito da ligação de GlnK a GlnR sobre a atividade de ligação de GlnR ao DNA foi testada. Observou-se a formação de complexos ternários GlnK-GlnR-DNA em experimentos de retardamento de banda de DNA em gel, confirmando a interação estável entre as proteínas. Além disso, GlnR ligada a GlnK apresenta maior afinidade pelo DNA (Figuras 27 e 28). Isto sugere um papel regulatório de GlnK na repressão de genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio mediado por GlnR.

#### 5.5 Efeito de ADP, ATP e 2-oxoglutarato sobre o complexo ternário GlnK-GlnR-DNA

O papel das moléculas sinalizadoras de GlnK foi estudado em experimentos de retardamento de banda de DNA em gel, contendo GlnR, GlnK e fragmentos de DNA contendo as regiões promotoras reconhecidas por GlnR (Figuras 30 a 33).

Nestes experimentos, houve formação do complexo GlnK-GlnR-DNA em todas as condições (Figura 30, linhas 5 a 9). Concentrações fixas de ADP (0,5mM), ATP (0,5mM) e 2-oxoglutarato (1mM) foram adicionadas às reações nestes experimentos. Para verificar se a ausência de efeito destas moléculas era devida às concentrações utilizadas, foram realizadas curvas de concentração (Figuras 31, 32 e 33). Nestas curvas não houve diferença no padrão de migração dos fragmentos de DNA em concentrações de 0,5 a 10,0mM de 2-oxoglutarato, 0,1 a 5,0mM de ADP e 0,1 a 5,0mM de ATP. Os resultados obtidos nestes experimentos de retardamento de banda de DNA em gel mostram que, em presença de DNA, 2-oxoglutarato, ADP e ATP não modulam a interação entre GlnR, GlnK-His e DNA. Este resultado confirma o obtido no ensaio de co-precipitação na presença de DNA (Figura 29 A), onde não houve variação na eluição conjunta de GlnK-His e GlnR, independentemente da presença de efetores.

#### 5.6 Possível efeito de DNA na estabilização do complexo GlnK-GlnR

Os experimentos de co-precipitação apresentaram resultados contrários com respeito ao efeito das moléculas sinalizadoras na presença ou ausência de DNA (Figura 29 A e B). Na presença de DNA o complexo GlnR-GlnK não foi afetado ao passo que na ausência de DNA houve uma diminuição de 5 vezes na formação do complexo GlnR-GlnK na presença de 2-oxoglutarato.

Tendo em vista este aparente efeito do DNA na estabilização do complexo GlnR-GlnK, os experimentos de retardamento de banda de DNA em gel foram repetidos com modificações. As proteínas GlnR e GlnK foram incubadas na presença de efetores e na ausência de DNA para permitir a formação do complexo. Em seguida foram adicionados os fragmentos de DNA contendo a região promotora dos operons *glnRA* e *amtBglnK*. Dessa forma seria possível observar um possível efeito das moléculas sinalizadoras sobre o complexo antes de sua ligação ao DNA (Figura 33). Na presença de 2-oxoglutarato, a banda de DNA livre foi mais intensa quando comparada à observada na ausência de efetores (Figura 33, linhas 7, 8 e 9). Este resultado confirma que 2-oxoglutarato inibe a formação do complexo antes de sua ligação ao DNA, efeito observado no ensaio de co-precipitação (Figura 29 B).



Figura 35: Alinhamento de sequência das proteínas GlnK de *S. elongatus*, GlnZ de *A. brasilense* e GlnK de *S. mutans*.

```

GlnK S. elongatus MKKIEAIIRPFKLDEVKIALVNAG-IVGMTVSEVRGFGGRQKGQTERYRGS 49
GlnZ A. brasilense MKLVMAI IKPFKLDEVREALTSLG-IQGLTVSEVKGFGRQKGQTEIYRGA 49
GlnK S. mutans MKKIEAIIRSDKLEDLKAALVQSGFIKGMTISQVLGFGNQRGYTEYVRGQ 50
                                     * * * *

GlnK S. elongatus EYTVEFLQKLKLEI VVEDAQVDTVIDKIVAAARTGENGDGKIFVSPVDQT 99
GlnZ A. brasilense EYSVSFLPKVKVEVAVSDDQYEQVVEAIQKAANTGRIGDGKIFVLDIAQA 99
GlnK S. mutans KITPTLLAKVKVEI VAHDAAVEEMITTISQAVKTGEVGDGKIFVSPVDEI 100
                                     * * * *

GlnK S. elongatus IRIRTGEKNADAIS 113
GlnZ A. brasilense VRIRTGETNTEAL- 112
GlnK S. mutans VRIRTGERDGDAL- 113

```

O alinhamento foi gerado pelo programa Clustal W. Os resíduos importantes para a interação com 2-oxoglutarato estão identificados por asteriscos.

Estes resultados sugerem que os efetores de GlnK modulam sua interação com GlnR antes da ligação do complexo ao DNA. Além disso, nestas condições, a presença de 2-oxoglutarato desfavorece a interação entre GlnK e GlnR. Uma vez ligado ao DNA o complexo não é afetado por ADP, ATP e 2-oxoglutarato.

Todos os experimentos feitos neste trabalho foram realizados com a forma solúvel da proteína GlnK. Entretanto, após um choque de amônio a população intracelular de GlnK divide-se em duas. Uma parte permanece em sua forma solúvel e outra parte liga-se à membrana via AmtB. Este fenômeno foi descrito em vários microrganismos (Revisto por JAVELLE & MERRICK, 2005). Em *B. subtilis*, a quantidade de GlnK ligada à membrana via AmtB depende dos níveis celulares de ATP (HEINRICH et al., 2006). Na ausência de ATP há cerca de 50% de associação de GlnK a AmtB. O aumento progressivo na concentração de ATP disponível leva à solubilização do complexo. A adição de 2,5mM de ATP ao meio de cultivo leva a uma taxa de associação de GlnK a AmtB de 10% e em 5,0mM de ATP apenas 5% da proteína GlnK da célula encontra-se associada à AmtB (HEINRICH et al., 2006). Estas observações concordam com os resultados de Radchenko e colaboradores (2010) e Yuan e colaboradores (2009) que observaram uma queda nos níveis celulares de ATP após choque de amônio.

Análises *in silico* sugerem que a proteína GlnR de *S. mutans* apresenta alta similaridade de seqüência e de estrutura com TnrA de *B. subtilis* (Figuras 11 e 12). E em *B. subtilis*, TnrA interage com GlnK associada à membrana via AmtB. Os efetores 2-oxoglutarato e ATP desfazem o complexo ternário (HEINRICH et al., 2006). O efeito desta ligação sobre a atividade de TnrA permanece desconhecido. A análise destes dados pode sugerir que GlnR é capaz de interagir também com GlnK em sua forma ligada a AmtB. Neste caso, é possível que os efetores de GlnK modulem a formação do complexo AmtB-GlnK-GlnR-DNA, efeito que não foi observado nos experimentos descritos neste trabalho com o complexo GlnK-GlnR-DNA. Porém outros estudos precisam ser feitos para confirmar esta hipótese.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que GlnR desempenha um papel regulatório sobre a transcrição de genes do metabolismo de nitrogênio semelhante ao que ocorre em *B. subtilis* e outras bactérias Gram positivas. O mecanismo de regulação da atividade de GlnR por GlnK, aparentemente, é análogo ao papel de GS inibida por glutamina em *B. subtilis*, estabilizando o complexo GlnR-DNA. A informação sobre a disponibilidade de nitrogênio chega a GlnR via ligação com GlnK, através de 2-OG e ADP,

que inibem a formação do complexo. Este mecanismo de regulação resulta em atividade máxima de GlnR em situações de excesso de nitrogênio.

O gene *tnrA*, que codifica para a proteína TnrA foi identificado no genoma de *S. mutans* (CHEN et al., 2010). A identificação desta ORF pode significar que há regulação coordenada por GlnR e TnrA também neste microrganismo. A clonagem e purificação desta proteína permitirão verificar se há interação entre GlnK e TnrA semelhante ao que ocorre com GlnR e se esta interação afeta a ligação de TnrA ao DNA.

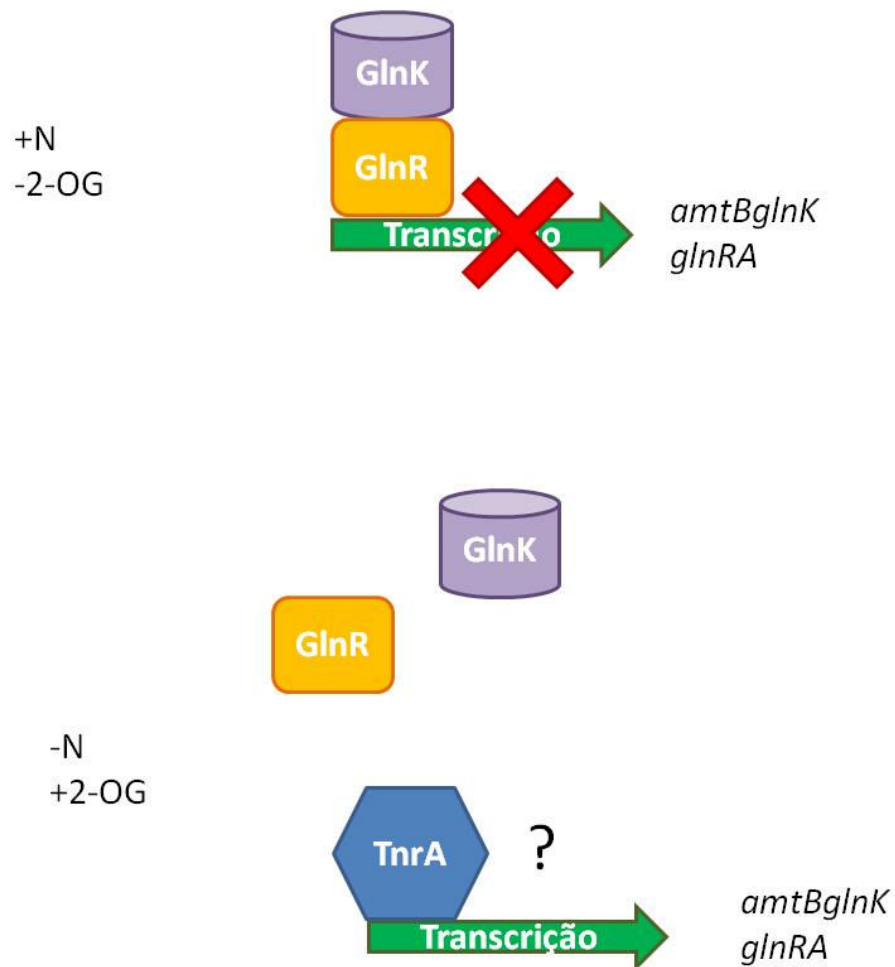
### 5.7 Modelo de regulação da atividade de GlnR

Normalmente *S. mutans* vive em biofilmes dentais compostos por várias espécies, neste ambiente, ocorrem mudanças rápidas e significativas na disponibilidade de nitrogênio. Este microrganismo ajusta seu metabolismo e padrões de expressão gênica para sobreviver em diferentes condições (LEMOS et al., 2005). Um aumento repentino nos níveis de compostos nitrogenados após um período de limitação deste nutriente pode ser a condição necessária para a modulação da atividade de GlnR por GlnK.

Provavelmente em *S. mutans*, como em outros organismos, GlnK é sintetizada em baixos níveis de nitrogênio intracelular, e GlnR é ativa quando há excesso de nitrogênio, neste caso a formação do complexo GlnK-GlnR seria um importante meio de aumentar a repressão da transcrição de genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio após um choque de amônio.

Os resultados descritos neste trabalho foram utilizados para propor um modelo de regulação da atividade de GlnR por GlnK (Figura 36). Na ausência de 2-oxoglutarato (altos níveis de nitrogênio) a formação do complexo GlnR-GlnK é favorecida. GlnR em sua forma ligada a GlnK têm a afinidade pelo DNA aumentada o que resulta num maior nível de repressão dos genes controlados por GlnR. Em altas concentrações intracelulares de 2-oxoglutarato (baixos níveis de nitrogênio) a formação do complexo GlnR-GlnK é inibida. Possivelmente, neste microrganismo, TnrA e GlnR reconheçam o mesmo sítio de ligação, como descrito para *B. subtilis* (WRAY et al., 2001). Como em escassez de nitrogênio a afinidade de GlnR pelo DNA é diminuída, a ligação de TnrA seria favorecida, resultando na ativação da transcrição a partir dos promotores reconhecidos por esta proteína.

Figura 36: Modelo de controle da atividade de GlnR por GlnK em *S. mutans*



Em condições de excesso de nitrogênio, nas quais há baixos níveis de 2-oxoglutarato, GlnK interage com GlnR, aumentando a repressão da transcrição a partir dos promotores de genes envolvidos na assimilação de nitrogênio, como por exemplo, os operons *amtBglnK* e *glnRA*. Em baixas concentrações de nitrogênio no ambiente, a concentração de 2-oxoglutarato intracelular é elevada, esta molécula sinalizadora inibe a formação do complexo GlnK-GlnR e sua ligação ao DNA. Nestas condições, é possível que a proteína TnrA ligue-se aos promotores ativando sua transcrição.

## 6. CONCLUSÕES

1. Neste trabalho foram determinadas as melhores condições para expressão e purificação da proteína GlnR de *S. mutans* na sua forma nativa e fusionada à uma sequência de histidinas;
2. A capacidade de ligação de GlnR às regiões promotoras dos operons *amtBglN*K e *glnRA* foi confirmada por ensaio de retardamento de banda de DNA em gel de poliacrilamida.
3. Ensaio de co-precipitação mostraram que as proteínas GlnK e GlnR de *S. mutans* interagem *in vitro*. Na ausência de DNA essa interação é inibida por 2-oxoglutarato e ADP, ao passo que a presença de DNA estabiliza a interação em todas as condições testadas.
4. GlnR ligada à GlnK tem maior afinidade pelo DNA contendo as regiões promotoras do operon *glnRA* do que sua forma livre.
5. A ligação GlnR ao DNA não é afetada pelos efetores 2-oxoglutarato, ADP e ATP.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, M., BORSCH, C. M., TAYLOR, S. S., VAZQUEZ-LASLOP, N., NEYFAKH, A. A. **J. Biol Chem.** v. 269, p. 28506-28513, 1994.

AJDIC D., MCSHAN, W.M., MCLAUGHLIN, R. E., SAVIC, G., CHANG, J., CARSON, M.B., PRIMEAUX, C., TIAN, R., KENTON, S., JIA, H., LIN, S., QIAN, Y., LI, S., ZHU, H., NAJAR, F., LAI, H., WHITE, J., ROE, B.A., FERRETTI, J.J. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 99, p. 14434-9, 2002.

ALALUUSUA, S.; ALALUUSUA, S. J.; KARJALAINEN, J.; SAARELA, M.; HOLTINEN, T.; KALLIO, M.; HOLTTA, P.; TORKKO, R.; RELANDER, P.; ASIKAINEN, S. The demonstration by ribotyping of the stability of oral *Streptococcus mutans* infection over 5 to 7 years in children. **Arch. Oral. Biol.**, Oxford, v. 39, p. 467-471, 1994.

ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHÄFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res** v. 25, p. 3389-3402, 1997.

AMON, J., TITGEMEYER, F., BURKOVSKI, S. Common patterns - unique features: nitrogen metabolism and regulation in Gram-positive bacteria. **FEMS Microbiol Rev.** v. 34, p.588-605, 2010.

ARCONDÉGUY, T., JACK, R., MERRICK, M. PII signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. **Microbiol Mol Biol Rev.** v. 65, p. 80-105, 2001.

ATKINSON, M. R.; FISHER, S. H. Identification of genes and genes products whose expression is activated during nitrogen-limited growth in *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 173, p. 23-27, 1991.

BANAS J A.. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. **Front Biosci** v.9, p.1267-77, 2004.

BATES, P.A., KELLEY, L.A., MAC CALLUM, R.M., STERNBERG, M.J. Enhancement of protein modeling by human intervention in applying the automatic programs 3D- JIGSAW and 3D-PSSM. **Proteins**, v. 5, p.39-46, 2001.

BECKERS, G., STRÖSSER, J., HILDEBRANDT, T., KALINOWSKI J., FARWICK, M., KRAMER, R., BURKOVSKI, A. Regulation of AmtR-controlled gene expression in *Corynebacterium glutamicum*: mechanism and characterization of the AmtR regulon. **Mol Microbiol** v. 58, p. 580-595, 2005.

BELITSKY, B. R., WRAY, L. V. JR, FISHER, S. H., BOHANNON, D. E., SONENSHEIN, A. L. Role of TnrA in nitrogen source-dependent repression of *Bacillus subtilis* glutamate synthase gene expression. **J Bacteriol** v.182, p.5939-594, 2000.

BELITSKY, B. R., SONENSHEIN A. L., Modulation of activity of *Bacillus subtilis* regulatory proteins GltC and TnrA by glutamate dehydrogenase. **J Bacteriol** v. 186, p. 3399-3407, 2004.

BELITSKY, B. R., KIM. H. J., SONENSHEIN, A. L. CcpA-dependent regulation of *Bacillus subtilis* glutamate dehydrogenase gene expression. **J. Bacteriol.** v. 186, p. 3392-3398, 2004.

BENDER, R. A., MACALUSO, A., MAGASANIK, B. Glutamate dehydrogenase: genetic mapping and isolation of regulatory mutants of *Klebsiella aerogenes*. **J Bacteriol** v. 127, p.141-8, 1976.

BOHANNON D. E., SONENSHEIN, A. L., Positive regulation of glutamate biosynthesis in *Bacillus subtilis*. **J Bacteriol.** v. 171, p. 4718-27, 1989.

BRADFORD, M. M.; A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRADSHAW, D.J., MARSH, P.D. Analysis of pH-driven disruption of oral microbial communities *in vitro*. **Caries Res.**, v. 32, p. 456-62, 1998.

BRANDENBURG, J. L., WRAY, L. V. JR., BEIER, L., JARMER, H., SAXILD, H. H., FISHER, S. H. Roles of PucR, GlnR, and TnrA in regulating expression of the *Bacillus subtilis* ure P3 promoter. **J Bacteriol** v. 184, p. 6060–6064, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Departamento de Assistência e Promoção à Saúde. Coordenação de Saúde Bucal. Condições de Saúde Bucal da População Brasileira, 2002-2003. Disponível em: <[http://cfo.org.br/wp-content/uploads/2009/10/04\\_0347\\_M.pdf](http://cfo.org.br/wp-content/uploads/2009/10/04_0347_M.pdf)> Acesso em: outubro de 2010

BRYSON, K., MCGUFFIN, L. J., MARSDEN, R. L., WARD, J. J., SODHI, J. S., JONES, D. T. Protein structure prediction servers at University College London. **Nucl. Acids Res.** v. 33, p. 36-38, 2005.

BROWN, M.S., SEGAL, A., STADTMAN, E. R. Modulation of glutamine synthetase adenylylation and deadenylylation is mediated by metabolic transformation of the PII regulatory protein. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 68, p. 2949-2953, 1971.

BROWN S.W., SONENSHEIN, A. L., Autogenous regulation of the *Bacillus subtilis* *glnRA* operon. **J Bacteriol** v. 178, p.2450-2454, 1996.

BROWN, N. L., STOYANOV, J. V., KIDD, S. P., HOBMAN, J. L. The MerR family of transcriptional regulators **FEMS Microbiol Rev** v. 27, p.145-163, 2003.

BURILLO, S., LUQUE, I., FUENTES, I., CONTRERAS, A. Interactions between the nitrogen signal transduction protein PII and N-acetyl glutamate kinase in organisms that perform oxygenic photosynthesis. **J Bacteriol** v. 186, p. 3346-3354, 2004.

CAMACHO, A., SALAS, M. Effect of mutations in the “extended -10” motif of three *Bacillus subtilis* sigma-RNA polymerase-dependent promoters **J Mol Biol.** v. 286, p. 683-93, 1999.

CHEN, P. M., CHEN, Y. Y. M., YU, S. L., SHER, S. LAI, C. H. CHIA J. S. Role of GlnR in Acid-Mediated Repression of Genes Encoding Proteins Involved in Glutamine and Glutamate Metabolism in *Streptococcus mutans*. **Appl. Environ. Microbiol.** Vol. 76, n. 8, 2478-2486, 2010.

CLARKE, J. K. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. **Br. J. Exp. Pathol.** v. 5, p. 141-147, 1924.

COUTTS G, THOMAS G, BLAKEY D, MERRICK M. Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. **EMBO J.** Feb 15;21(4):536-45, 2002.

CVITKOVITCH, D. G., GUTIERREZ, J. A., BLEIWEIS, A. S. Role of citrate pathway in glutamate biosynthesis by *Streptococcus mutans*. **J. Bacteriol.** v. 179, p. 650-655, 1997.

CVITKOVITCH, D. G.; YUNG-HUA, L.; ELLEN, R. P. Quorum sensing and biofilm formation in streptococcal infections. **J. Clin. Invest.**, Washington, v. 112, p. 1626-1632, 2003.

DASHPER, S. G.; REYNOLDS, E. C. Branched-chain amino acid transport in *Streptococcus mutans* Ingbritt. **Oral Microbiol. Immunol.** v. 8, p. 167-171, 1993.

DE SOET, J. J., NYVAD, B., KILIAN, M. Strain-related acid production by oral streptococci. **Caries Res.** v. 34, p. 486-90, 2000.

DETSCH, C., STÜLKE, J. Ammonium utilization in *Bacillus subtilis*: transport and regulatory functions of NrgA and NrgB. **Microbiology.** v. 149, p.3289-97, 2003.

DOROSHCHUK, N. A., GELFAND, M. S., RODIONOV, D. A. Regulation of nitrogen metabolism in Gram-positive bacteria. **Mol Biol** v. 40, p. 919–926, 2006.

DURAND, A., MERRICK, M. In vitro analysis of the *Escherichia coli* AmtB-GlnK complex reveals a stoichiometric interaction and sensitivity to ATP and 2-oxoglutarate. **J Biol Chem** v. 281, p. 29558-67, 2006.

EBERSOLE, J. L., TAUBMAN, M. A. The protective nature of host responses in periodontal diseases. **Periodontol 2000** v. 5, p. 112-41, 1994.

ESPINOSA, J., FORCHHAMMER, K., BURILLO, S., CONTRERAS, A. Interaction network in cyanobacterial nitrogen regulation: PipX, a protein that interacts in a 2-oxoglutarate dependent manner with PII and NtcA. **Mol Microbiol.** v. 61, p. 457-69, 2006.

ESPINOSA, J., FORCHHAMMER, K., CONTRERAS, A. Role of the *Synechococcus* PCC 7942 nitrogen regulator protein PipX in NtcA-controlled processes. **Microbiology** v. 153, p. 711-8, 2007.



FAIRES N., TOBISCH S., BACHEM S., MARTIN-VERSTRAETE I., HECKER M., STULKE J. The catabolite control protein CcpA controls ammonium assimilation in *Bacillus subtilis*. **J Mol Microbiol Biotechnol.** v. 1, p. 141-8, 1999.

FEJERSKOV, O.; THYLSTRUP, A. Diferentes conceitos sobre a cárie dentária e suas implicações. In: THYLSTRUP, A., FEJERSKOV, O. **Cariologia clínica**. 3.ed. São Paulo, Ed. Santos,. Cap. 9, p.209-217. 2001.

FERIA-BOURRELLIER, A. B., VALOT, B., GUILLOT, A., AMBARD-BRETTEVILLE, F., VIDAL, J., HODGES, M. Chloroplast acetyl-CoA carboxylase activity is 2-oxoglutarate-regulated by interaction of PII with the biotin carboxyl carrier subunit. **Proc Natl Acad Sci**, v. 107, p. 502-507, 2010.

FISHER S. H., WRAY, L. V. Jr., *Bacillus subtilis* glutamine synthetase regulates its own synthesis by acting as a chaperone to stabilize GlnR-DNA complexes. **P Natl Acad Sci USA** 105:1014-1019, 2008.

FISHER SH, SONENSHEIN AL. *Bacillus subtilis* glutamine synthetase mutants pleiotropically altered in glucose catabolite repression. **J Bacteriol.** v. 157, p. 612-21, 1984.

FISHER, S. H., SONENSHEIN, A. L. Control of carbon and nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*. **Annu Rev Microbiol.** v. 45, p.107-35, 1991.

FISHER, S. H., WRAY L. V. Jr, Novel trans-acting *Bacillus subtilis* *glnA* mutations that derepress *glnRA* expression. **J Bacteriol**, v. 191, p. 2485-2492, 2009.

FISHER, S. H., DÉBARBOUILLÉ, M. Nitrogen source utilization and its regulation in *Bacillus subtilis* and its closest relatives. In: SONENSHEIN, A. L.; HOCH, J. A.; LOSICK, R. (Ed.). **Genes to Cells**. Washington DC: American Society for Microbiology, p. 181-191, 2002.

FOKINA, O., CHELLAMUTHU, V. R., FORCHHAMMER, K., ZETH, K. Mechanism of 2-oxoglutarate signaling by the *Synechococcus* elongates PII transduction protein. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 107, p. 19760-19765, 2010.

FORCHHAMMER K. PII signal transducers: novel functional and structural insights. **Trends Microbiol.** v. 16, p. 65-72, 2008.

FORCHHAMMER, K., TANDEAU DE MARSAC, N. Functional analysis of the phosphoprotein PII (*glnB* gene product) in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. **J Bacteriol.** v. 177, p. 2033-40, 1995.

GASTEIGER, E., HOOGLAND, C., GATTIKER, A., DUVAUD, S., WILKINS, M. R., APPEL, R. D., BAIROCH, A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In John M. Walder (ed): **The Proteomics Protocols Handbook**, Humana Press, p. 571-607, 2005.

GIBRAT, J. F., MADEJ, T., BRYANT, S. H. Surprising similarities in structure comparison. **Curr Opin Struct Biol.** v. 6, p. 377-85, 1996.

GLÖER J, THUMMER R, ULLRICH H, SCHMITZ RA. Towards understanding the nitrogen signal transduction for *nif* gene expression in *Klebsiella pneumoniae*. **FEBS J.** v. 275, p. 6281-94, 2008.

GRIFFITH, C. J., CARLSSON, J. Mechanism of ammonia assimilation in streptococci. **J. Gen. Microbiol.** v. 82, p. 253-260, 1974.

GRUSWITZ, F., O'CONNELL, J. 3RD, STROUD, R. M. Inhibitory complex of the transmembrane ammonia channel, AmtB, and the cytosolic regulatory protein GlnK at 1,96Å. **Proc Natl Acad Sci USA** v. 104, p. 42-7, 2007.

GUSTAFSON J, STRASSLE A, HACHLER H, KAYSER FH & BERGER-BÄCHI B The *femC* locus of *Staphylococcus aureus* required for methicillin resistance includes the glutamine synthetase operon. **J Bacteriol** 176: 1460–1467, 1994.

GUTOWSKI, J. C., SCHREIER, H. J. Interaction of the *Bacillus subtilis* *glnRA* repressor with operator and promoter sequences *in vivo*. **J Bacteriol** v.174, p. 671-81, 1992.

HAMADA, S., SLADE, H. D. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiol Rev.** v. 44, p. 331-84, 1980.

HEINRICH, A., MAHESWARAN, M., RUPPERT, U., FORCHHAMMER, K. The *Synechococcus elongatus* PII signal transduction protein controls arginine synthesis by complex formation with N-acetyl-L-glutamate kinase. **Mol Microbiol** v. 52, p. 1303-1314, 2004.

HEINRICH, A., WOYDA, K., BRAUBURGER, K., MEISS, G., DETSCH, C., STÜLKE, J., FORCHHAMMER, K. Interaction of the membrane bound GlnK–AmtB complex with the master regulator of nitrogen metabolism TnrA in *Bacillus subtilis*. **J Biol Chem** v. 281, p.34909–34917, 2006.

HELDWEIN, E. E. Z., BRENNAN, R. G. Crystal structure of the transcription activator BmrR bound to DNA and a drug. **Nature** v. 409, p. 378-382, 2001.

HELMANN, J. D. Compilation and analysis of *Bacillus subtilis*  $\sigma$ A-dependent promoter sequences: evidence for extended contact between RNA polymerase and upstream promoter DNA. **Nucl. Acids Res.** v. 23, p. 2351-2360, 1995.

HENDRIKSEN, W. T., KLOOSTERMAN, T. G., BOOTSMA, H. J., ESTEVÃO, S., DE GROOT, R., KUIPERS, O. P., HERMANS, P. W. Site-specific contributions of glutamine-dependent regulator GlnR and GlnR-regulated genes to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun** v. 76, p. 1230–1238, 2008.

HESKETH, A., FINK, D., GUST, B., REXER, H. U., SCHEEL, B., CHATER, K., WOHLLEBEN, W., ENGELS, A. The GlnD and GlnK homologues of *Streptomyces coelicolor* A3(2) are functionally dissimilar to their nitrogen regulatory system counterparts from enteric bacteria. **Mol Microbiol.** v. 46, p. 319-30, 2002.

HUERGO, L. F., MERRICK, M., PEDROSA, F. O., CHUBATSU, L. S., ARAUJO, L.M., SOUZA, E. M. Ternary complex formation between AmtB, GlnZ and the nitrogenase regulatory enzyme DraG reveals a novel facet of nitrogen regulation in bacteria. **Mol. Microbiol.** v. 66, p. 1523- 1535, 2007.

JAYARAMAN, G. C., PENDERES, J. E.; BURNE, R. A. Transcriptional analysis of the *Streptococcus mutans* *hrcA*, *grpE* and *dnak* genes and regulation of expression in response to heat shock and environment acidification. **Mol. Microbial.**, Oxford, v. 25, p. 329-341,1997.

JAVELLE, A., SEVERI, E., THORNTON, J., MERRICK, M. Ammonium sensing in *Escherichia coli*. **J Biol Chem** v. 279, p. 8530-8538, 2004.

JAVELLE, A., LUPO, D., LI, X. D., MERRICK, M., CHAMI, M., RIPOCHE, P., WINKLER, F. K. Structural and mechanistic aspects of Amt/Rh proteins. **J Struct Biol** v. 158, p. 472-81, 2007.

JAVELLE, A., MERRICK M. Complex formation between AmtB and GlnK: an ancestral role in prokaryotic nitrogen control. **Biochem Soc Trans** v. 33, p. 170-2, 2005.

JENSEN, M E., SCHACHTELE, C. F. Plaque pH measurements by different methods on the buccal and approximal surfaces of human teeth after a sucrose rinse. **J. Dent. Res.** v. 62, p. 1058-1061, 1983.

JIANG, P., PELISKA, J. A., NINFA, A. J. Enzimological characterization of the signal-transducing uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme (EC 2.7.7.59) of *Escherichia coli*. **Biochemistry**. V. 37, p. 12782-12794, 1998.

JIANG, P., NINFA, A. J. *Escherichia coli* PII signal transduction protein controlling nitrogen assimilation acts as a sensor of adenylate energy charge *in vitro*. **Biochemistry**. v. 13, p. 46, p. 12979-96, 2007.

JIANG, P., NINFA, A. J. Sensation and signaling of alpha-ketoglutarate and adenylate energy charge by the *Escherichia coli* PII signal transduction protein require cooperation of the three ligand-binding sites within the PII trimer. *Biochemistry*, v. 48, p. 11522-31, 2009.

KAMBEROV E. S., ATKINSON, M. R., FENG. J., CHANDRAN, P., NINFA, A. J. Sensory components controlling bacterial nitrogen assimilation. **Cell Mol Biol Res.** v. 40, p.175-91, 1994.

KANG, D., GHO, Y. S., SUH, M., KANG, C. Highly sensitive and fast protein detection with Coomassie Brilliant Blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Bull Korean Chem Soc.* v. 23, p. 1511-1512, 2002.

KEILTY, S., ROSENBERG, M. Constitutive function of a positively regulated promoter reveals new sequences essential for activity. **J. Biol. Chem.** v. 262, p. 6389-6395, 1987.

KENNEY, L.J. Structure/function relationships in OmpR and other winged-helix transcription factors. **Curr Opin Microbiol** v. 5, p.135-141, 2002.

KLEINER, D. Bacterial ammonium transport. **FEMS Microbiol Rev.** v.32, p. 87-100, 1985.

KLOOSTERMAN, T. G., HENDRIKSEN, W. T., BIJLSMA, J. J., BOOTSMA, H. J., VAN HIJUM, S., KOK, J., HERMANS, P. W., KUIPERS, O. P. Regulation of glutamine and glutamate metabolism by GlnR and GlnA in *Streptococcus pneumonia*. **J Biol Chem** v. 281, p. 25097–25109, 2006.

KUMAR, A., MALLOCH, R. A., FUJITA, N., SMILLIE, D. A., ISHIHAMA, A., HAYWARD, R. S. The minus 35-recognition region of Escherichia coli sigma 70 is inessential for initiation of transcription at an ``extended -10`` promoter. **J. Mol. Biol.** v. 232, p. 406-418, 1993.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T7. **Nature**, v. 277, p. 680-685, 1970.

LARSEN, R., KLOOSTERMAN, T. G., KOK, J., KUIPERS, O. P. GlnR mediated regulation of nitrogen metabolism in *Lactococcus lactis*. **J Bacteriol** v. 188, p. 4978–4982, 2006.

LEMOS, J. A., ABRANCHES, J., BURNE, R. A. Responses of cariogenic streptococci to environmental stresses. **Curr Issues Mol. Biol.**, Washington, v.7, p. 95-108, 2005.

LEMOS, J. A., BURNE, R. A. Regulation and physiological significance of ClpC and ClpP in *Streptococcus mutans*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 184, p. 6357-6366, 2002.

LIAO, W. L., RAMÓN, A. M., FONZI, W. A. GLN3 encodes a global regulator of nitrogen metabolism and virulence of *C. albicans*. *Fungal Genet Biol.* v. 45, p. 514-26, 2008.

LLOYD, G., LANDINI, P., BUSBY, S. Activation and repression of transcription initiation in bacteria. **Essays Biochem.** v. 37, p. 17-31, 2001.

MA, H. BOOGERD, F. C., GORYANIN, I. Modelling nitrogen assimilation of Escherichia coli at low ammonium concentration. **J Biotechnol.** v. 144, p. 175-83, 2009.

MAGASANIK, B. The regulation of nitrogen utilization in enteric bacteria. **J Cell Biochem.** v. 51, p. 34-40, 2003.

MAHESWARAN, M., URBANKE, D., FORCHHAMMER, K. Complex formation and catalytic activation by the PII signaling protein of N-acetyl-L-glutamate kinase from *Synechococcus elongatus* strain PCC7942. **J Biol Chem** v. 279, p. 55202-55210, 2004.

MARSH, P. D. Are dental disease examples of ecological catastrophe? **Microbiol.;** Reading, v. 149, p. 279-294, 2003.

MARSH, P. D. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. **Adv. Dent. Res.**, Washington, v. 8, p. 263, 1994.

MARTIN, E. J. ST.; WITTENBERGER, C. L. Regulation and function of ammonia-assimilating enzymes in *Streptococcus mutans*. **Infect. Immun.**, v. 28, p. 220-224, 1980.

MERRICK, M. J., EDWARDS, R. A. Nitrogen control in bacteria. **Microbiol Rev.** v. 59, p. 604-22, 1995.

MERRICK, M., JAVELLE, A., DURAND, A., SEVERI, E., THORNTON, J., AVENT, N.D., CONROY, M.J., BULLOUGH, P.A. (2006) The *Escherichia coli* AmtB protein as a model system for understanding ammonium transport by Amt and Rh proteins. **Transfus Clin Biol.** Mar-Apr;13(1-2):97-102, 2006.

NAKANO, M. M., YANG, F., HARDIN, P., ZUBER, P. Nitrogen regulation of *nasA* and the *nasB* operon, which encode genes required for nitrate assimilation in *Bacillus subtilis*. **J Bacteriol** v. 177, p. 573-9, 1995.

NINFA, A. J., ATKINSON, M. R. PII signal transduction proteins. **Trends Microbiol.** v. 8, p. 172-9, 2000.

NINFA, A. J., JIANG, P. PII signal transduction proteins: sensors of alpha-ketoglutarate that regulate nitrogen metabolism. **Curr Opin Microbiol.** v. 8, p.168-73, 2005.

NOJI, S.; SATO, Y.; SUZUKI, R.; TANIGUCHI, S. Effect of intracellular pH and potassium ions on a primary transport system for glutamate/aspartate in *Streptococcus mutans*. **Eur. J. Biochem.** v. 175, p. 491-495, 1988.

O'HALLORAN, T. V., WALSH, C. T. Positive and negative control of prokaryotic gene-expression by a metalloprotein: purification and characterization of the MerR regulatory protein. **J. Cell Biochem. Suppl.** v. 10, p. 104, 1986.

PARKER, M. T.; BALL, L. C. Streptococci and aerococci associated with systemic infection in man. **J. Med. Microbiol.**, Reading, v. 9 (3) p. 275-302, 1976.

PICOSSI, S., BELITSKY, B, R., SONENSHEIN, A. L. Molecular mechanism of the regulation of *Bacillus subtilis* *gltAB* expression by GltC. **J. Mol. Biol.** v. 365, p. 1298-1313, 2007.

POHL, K., FRANCOIS, P., STENZ, L., SCHLINK, G., GEIGER, T., HERBERT, S., GOERKE, C., SCHRENZEL, J., WOLZ, C. CodY in *Staphylococcus aureus* a regulatory link between metabolism and virulence gene expression. **J. Bacteriol.** v. 191, p. 2953-63, 2009.

POLISSI, A., PONTIGGIA, A., FEGER, G., ALTIERI, M., MOTTI, H., FERRARI, L., SIMON, D. L. Large-scale identification of virulence genes from *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.** v. 66, p. 5620-9, 1998.

PONNAMBALAM, S., WEBSTER, C., BINGHAM, A., BUSBY, S. Transcription initiation at the *Escherichia coli* galactose operon promoters in the absence of the normal  $\gamma$ 35 region sequences. **J. Biol. Chem.** v. 261, p. 16043-16048, 1986.

PORTUGAL, Magda Eline Guerrart. Caracterização da proteína GlnK de *Streptococcus mutans*. Curitiba, 2006. 110f. Dissertação (mestrado em Ciências-Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

QUIVEY, R. G.; KUHNERT, W. L.; HAHN, K. Genetics of acid adaptation in oral streptococci. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 12, p. 301-314, 2001.

RADCHENKO, M. V., THORNTON, J., MERRICK, M. Control of AmtB-GlnK complex formation by intracellular levels of ATP, ADP and 2-oxoglutarate. **J Biol Chem.** v. 285, p. 31037-45, 2010.

RADIONOV, D. A. Comparative genomic reconstruction of transcriptional regulatory networks in bacteria. **Chem. Rev.** v. 107, p. 3467-3497, 2007.

REEDER, J.C.; WESTWELL, A.J.; HUTCHINSON, D. N. Indifferent streptococci in normal and purulent eyes of neonates. **J. Clin. Pathol.**, v. 38 (8) p. 942-945, 1985.

SANDERS, J. W., VENEMA, G., KOK, J., LEENHOUTS, K. Identification of a sodium chloride-regulated promoter in *Lactococcus lactis* by single-copy chromosomal fusion with a reporter gene. **Mol. Gen Genet**, v. 257, p. 681-685, 1998.

SANT'ANNA, F. H., TRENTINI, D. B., DE SOUTO WEBER, S., CECAGNO, R., DA SILVA, S. C., SCHRANK, I. S. The PII superfamily revised: a novel group and evolutionary insights. **J. Mol. Evol.** v. 68, p. 322-336, 2009.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAYLE, R. A., MILNER-WHITE, E. J. RASMOL: biomolecular graphics for all. **Trends Biochem Sci.** v. 20, p. 374, 1995.

SCHÄGGER, H. Tricine-SDS-PAGE. **Nature Protocols** v. 1, p. 16-22, 2006.

SCHREIER, H. J., BROWN, S. W., HIRSCHI, K. D., NOMELLINI, J. F., SONENSHEIN, A. L. Regulation of *Bacillus subtilis* glutamine synthetase gene expression by the product of the *glnR* gene. **J Mol Biol.** v. 210, p. 51-63, 1989.

SCHREIER, H. J., CARUSO, S. M., MAIER, K. C. Control of *Bacillus subtilis* glutamine synthetase expression by GlnR from *Staphylococcus aureus*. **Curr Microbiol** v. 41, p. 425-429, 2000.

SCHULTZ J, MILPETZ F, BORK P, PONTING CP. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 95, p. 5857-64, 1998.

SHAPIRO B. M., STADTMAN, E., R. 5'-Adenylyl-O-tyrosine: the novel phosphodiester residue of adenylylated glutamine synthetase from *Escherichia coli*. **J Biol Chem** v. 243, p. 3769-3771, 1968.

SMITH, C. S., WELJLE A. M., MOORHEAD, G. B. Molecular properties of the putative nitrogen sensor PII from *Arabidopsis thaliana*. **Plant J** v. 33, p. 353-360, 2003.

SOCRANSKY, S. S., HAFFAJEE, A. D., CUGINI, M. A., SMITH, C., KENT, R. L. Jr Microbial complexes in subgingival plaque. **J Clin Periodontol.** v. 25, p. 134-44, 1998.

SOMERVILLE, G. A., PROCTOR, R. A. At the Crossroads of Bacterial Metabolism and Virulence Factor Synthesis in Staphylococci. **Microbiol Mol Biol Reviews**, v. 73, p. 233-248, 2009.

TAMURA, G. S., NITTAYAJARN, A., SCHOENTAG, D., L. A glutamine transport gene, *glnQ*, is required for fibronectin adherence and virulence of group B streptococci. **Infect Immun** v. 70, p. 2877-2885, 2002.

TEIXEIRA, P. F., JONSSON, A., FRANK, M., WANG, H., NORDLUND, S. Interaction of the signal transduction protein GlnJ with the cellular targets AmtB1, GlnE and GlnD in *Rhodospirillum rubrum*: dependence on manganese, 2-oxoglutarate and the ADP/ATP ratio. **Microbiology** v. 154, p. 2336-47, 2008.

TODD, E. W., HEWITT, L. F. A new culture medium for the production of antigenic streptococcal haemolysin. **J. Pathol. Bacteriol.** v. 35, p. 973, 1932.

THOMAS G. H., MULLINS J. G., MERRICK, M. Membrane topology of the Mep/Amt family of ammonium transporters. **Mol Microbiol.** v. 37, p. 331-44, 2000.

THOMPSON, J. D., HIGGINGS, D.G., GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.** v. 22, p. 4673-80, 1994.

TRUAN, D., HUERGO, L. F., CHUBATSU, L. S., MERRICK, M., LI, X. D., WINKLER, F. K. A New PII Protein Structure Identifies the 2-Oxoglutarate Binding Site **J. Mol. Biol.** v. 400, p. 531-539, 2010.

VAN ALST, N. E., PICARDO, K. F., IGLEWSKI B. H., HAIDARIS C. G. Nitrate sensing and metabolism modulate motility, biofilm formation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. **Infect Immun** v. 75, p. 3780-3790, 2007.

VAN HEESWIJK WC, HOVING S, MOLENAAR D, STEGEMAN B, KAHN D, WESTERHOFF HV. An alternative PII protein in the regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. **Mol Microbiol.** 21(1):133-46, 1996.

- VAN HOUTE, J. Bacterial specificity in the etiology of dental caries. **Int. Dent. J.**, Guildford, v.30, p.305-3 26, 1980.
- VAN SCHAIK W, CHÂTEAU A, DILLIES MA, COPPÉE JY, SONENSHEIN AL & FOUET A The global regulator CodY regulates toxin gene expression in *Bacillus anthracis* and is required for full virulence. **Infect Immun** v. 77, p. 4437–4445, 2009.
- VARMANEN, P., SAVIJOKI, K., AVALL, S., PALVA, A., TYNKKYNEN, S. Xprolyl dipeptidyl aminopeptidase gene (pepX) is part of the *glnRA* operon in *Lactobacillus rhamnosus*. **J Bacteriol** v. 182, p. 146–154, 2000.
- VAZQUEZ-LASLOP, N., MARKHAM, P., N. NEYFAKH, A., A. **Biochemistry** v. 38, p. 16925-16931, 1999.
- VOSKUIL, M. I., CAMBLISS, G. H. The TRTGn motif stabilizes the transcription initiation open complex. **J. Mol. Biol.** v. 322, p. 521-532, 2002.
- WEISS, V., KRAMER, G., DÜNNEBIER, T., FLOTHO, A. Mechanism of regulation of the bifunctional histidine kinase NtrB in *Escherichia coli*. **J Mol Microbiol Biotechnol.** v. 4, p. 229-33, 2002.
- WILKINS, J. C., HOMER K. A., BEIGHTON, D., Analysis of *Streptococcus mutans* Proteins Modulated by Culture under Acidic Conditions. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 2382-2390, 2002.
- WOLFE, D. M., ZHANG, Y., ROBERTS, G. P. Specificity and regulation of interaction between the PII and AmtB1 proteins in *Rhodospirillum rubrum*. **J Bacteriol** v. 189, p. 6861-9, 2007.
- WRAY, L. V. JR, ATKINSON, M. R., FISHER, S. H. The nitrogen-regulated *Bacillus subtilis* *nrgA* operon encodes a membrane protein and a protein highly similar to the *Escherichia coli* *glnB*-encoded PII protein. **J Bacteriol.** v. 176, p.108-14, 1994.
- WRAY, L. V. JR, FERSON, A. E., ROHRER, K., FISHER, S. H. TnrA, a transcription factor required for global nitrogen regulation in *Bacillus subtilis*. **P Natl Acad Sci USA** v. 93, p. 8841–8845, 1996.
- WRAY, L. V. JR, FERSON, A. E., FISHER, S. H. Expression of the *Bacillus subtilis* *ureABC* operon is controlled by multiple regulatory factors including CodY, GlnR, TnrA, and Spo0H. **J Bacteriol** v. 179, p. 5494–5501, 1997.
- WRAY, L. V. JR, ZALIECKAS, J. M., FERSON, A. E., FISHER, S. H. Mutational analysis of the TnrA-binding sites in the *Bacillus subtilis* *nrgAB* and *gabP* promoter regions. **J Bacteriol** v. 180, p. 2943–2949, 1998.
- WRAY, L. V. JR, ZALIECKAS, J. M., FISHER, S. H. *Bacillus subtilis* glutamine synthetase controls gene expression through a protein-protein interaction with transcription factor TnrA. **Cell.** v. 107, p. 427-35, 2001.



WRAY, L. V. Jr, FISHER, S. H. A feedback-resistant mutant of *Bacillus subtilis* glutamine synthetase with pleiotropic defects in nitrogen-regulated gene expression. **J Biol Chem.** v. 280, p.33298-304, 2005.

WRAY, L. V.; Jr, FERSON, A. E.; ROHRER, K.; FISHER, S. H.; TnrA, a transcription factor required for global nitrogen regulation in *Bacillus subtilis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 93, p. 8841-8845, 1996.

WRAY, L. V. JR, FISHER, S. H. *Bacillus subtilis* GlnR contains an autoinhibitory C-terminal domain required for the interaction with glutamine synthetase. **Mol Microbiol** v. 68, p. 277-85, 2008.

YILDIZ, O., KALTHOFF, C., RAUNSER, S., KÜHLBRANDT, W. Structure of GlnK1 with bound effectors indicates regulatory mechanism for ammonia uptake. **EMBO J** v. 26, p. 589-599, 2007.

YUAN, J., DOUCETTE, C. D., FOWLER, W. U., FENG, X. J., PIAZZA, M., RABITZ, H. A., WINGREEN, N. S., RABINOWITZ, J. D. Metabolomics-driven quantitative analysis of ammonia assimilation in *E.coli*. **Mol Syst Biol.** v. 5, p.302, 2009.

YAMADA, M., KUBO, M., MIYAKE, T., SAKAGUCHI, R., HIGO, Y. & IMANAKA, T. Promoter sequence analysis in *Bacillus* and *Escherichia*: construction of strong promoters in *E. coli*. **Gene**, v. 99, p. 109-114, 1991.

ZALIECKAS, J. M., WRAY, L. V. JR, FISHER, S. H. Cross-regulation of the *Bacillus subtilis* *glnRA* and *tnrA* genes provides evidence for DNA binding site discrimination by GlnR and TnrA. **J Bacteriol** v. 188, p. 2578–2585, 2006.

ZENG, Q.D., STALHANDSKE, C., ANDERSON, M.C., SCOTT, R.A. AND SUMMERS, A.O. The core metal-recognition domain of MerR. **Biochemistry** v. 37, p. 15885-15895, 1998.